

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
Keemia instituut

Maikel Pulk  
**TRÜPTOFAANI JA ARC-LUM(-) SONDI VAHELISE  
ENERGIAÜLEKANDE UURIMINE**  
Bakalaurusetöö

Juhendajad: Kadri Ligi, MSc

Asko Uri, PhD

Tartu 2014

# Sisukord

1.	Sissejuhatus .....	2
2.	Kasutatud lühendid .....	3
3.	Kirjanduse ülevaade .....	4
3.1.	Fotoluminestsents .....	4
3.1.1.	Fluorestsentsi anisotroopia .....	5
3.1.2.	Försteri resonantsenergia ülekanne .....	6
3.1.3.	Aegviivitusega luminestsentsi mõõtmine .....	7
3.1.4.	Luminestsentsi kustutamine .....	8
3.1.4.1.	Dünaamiline kustutamine .....	8
3.1.4.2.	Staatiline kustutamine .....	9
3.1.4.3.	Kustutamine FRETi ja Dexteri mehhanismide kaudu .....	10
3.1.4.4.	Kustutamine PET mehhanismi kaudu .....	11
3.2.	Trüptofaan .....	12
3.2.1.	Trüptofaani luminestsentsomadused .....	13
3.2.2.	Trüptofaan fluorestsentsi kustutajana .....	14
3.3.	Proteiinkinaasid .....	14
3.4.	ARC-tüüpi inhibiitorid .....	15
3.4.1.	ARC-Lum sondid .....	15
4.	Eksperimentaalne osa .....	18
4.1.	Kasutatud kemikaalid .....	18
4.2.	Trüptofaani molaarse neeldumiskoeffitsendi määramine .....	18
4.3.	Trüptofaani ja ARC-Lum(-) sondide neeldumisspektrite mõõtmine .....	18
4.4.	Fluorestsentspektrite mõõtmine ja töötlemine .....	19
4.5.	Trüptofaani ja ARC-Lum(-) sondi vahelise FRETi hindamine .....	20
4.6.	Aktiivse cAMP sõltuva proteiinkinaasi katalüütilise alaühiku kontsentratsiooni määramine ..	22
4.7.	ARC-Lum(-) sondi afiinsuse määramine PKAc suhtes .....	23
5.	Tulemused ja arutelu .....	24
5.1.	Trüptofaani neeldumisspekter ja molaarne neeldumiskoeffitsent .....	24
5.2.	ARC-Lum(-) sondide neeldumisspektrid .....	25
5.3.	ARC-Lum(-) sondi seondumine PKAc-le .....	26
5.4.	Trüptofaani ja ARC-Lum(-) sondi vaheline FRET .....	27
5.5.	ARC-Lum(-) sondide ja valguga vaheline FRET .....	29
6.	Kokkuvõte .....	35
7.	Summary .....	36
8.	Viited .....	37

# 1. Sissejuhatus

Organismide toimimise aluseks on rakkudevaheline suhtlus, mis toimub läbi keeruliste signaalvõrgustike. Neid võrgustikke reguleeritakse looduslike katalüsaatorite ehk ensüümide abil. Proteiinkinaasid katalüüsivad  $\gamma$ -fosforüülrühma ülekannet ATP-lt valgu seriini ja treoniini jääkidele, reguleerides seeläbi sihtmärkvalkude omadusi. Proteiinkinaaside vääraktiivsusega on seotud mitmeid rasked haigused, nagu vähktõbi, diabeet ja Alzheimeri tõbi. See on viinud vajaduseni konstrueerida molekule proteiinkinaaside aktiivsuse reguleerimiseks ning nende aktiivsuse seireks ja kaardistamiseks rakkudes ja kudedes.

Käesolevas bakalaaurusetöös uuriti uusi võimalusi Tartu Ülikooli keemia instituudis välja töötatud ARC-Lum(-) sondide fotoluminestsentsomaduste muutmiseks. Selles töös selgitati ARC-Lum(-) sondide uute struktuurielementide, trüptofaani jääkide, mõju sondide üldistele fotoluminestsentsomadustele. Töös uuriti erinevate spektraalmõõtmiste kasutatavust Försteri resonantsenergia ülekande intensiivsuse määramiseks trüptofaanijääkidelt kui energia doonoritelt ARC-Lum(-) sondide adenosini jäljendavale osale nii molekulisiseselt kui ka intermolekulaarselt valgu trüptofaanijääkidelt.

## 2. Kasutatud lühendid

ARC – adenosini analoogi ja oligoarginiini konjugaat

AGC kinaasid – proteiinkinaaside grupp, millesse kuuluvad PKA, PKC ja PKG perekondade ning mõned teised seriin/treoniinkinaasid

ATP – adenosiin-5'-trifosfaat

BSA – veise seerumi albumiin

cAMP – tsükliline adenosinmonofosfaat

DET – Dexteri elektronvahetus

DTT – ditiotreitol, (2S,3S)-1,4-bis(sulfanüül)butaan-2,3-diol

FA – fluorestsentsi anisotroopia

Fluorofoor – molekul või selle fragment, mis võib pärast ultravioletse ja nähtava elektromagnetkiirguse neelamist emitteerida fluorestsentskiirgust

Fosfoor – molekul või selle fragment, mis võib pärast ultravioletse ja nähtava elektromagnetkiirguse neelamist emitteerida fosforestsentskiirgust

FRET – Försteri resonantsenergia ülekanne

HEPES – (4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape

HOMO – kõrgeim hõivatud molekulaarorbitaal

$K_{SV}$  – Stern-Volmeri dünaamilise kustutamise konstant

$K_D$  – ligandi ja valgu vahelise kompleksi dissotsiatsioonikoefitsient, mis on määratud otsesidumise kaudu

$K_d$  – ligandi ja valgu vahelise kompleksi dissotsiatsioonikoefitsient, mis on määratud väljatõrjumise kaudu

Kromofoor – molekul või selle fragment, mis võib neelata ultravioletset ja nähtavat elektromagnetkiirgust

LUMO – madalaim hõivamata molekulaarorbitaal

PBS – fosfaat-puhverdatud soolalahus

PET – fotoindutseeritud elektronülekanne

PKAc – cAMP-sõltuva proteiinkinaasi katalüütiline alaühik

RET – resonantsenergia ülekanne

TAMRA – tetrametüülrodamiin

Trp – aminohape trüptofaan või selle jääk/jäägid

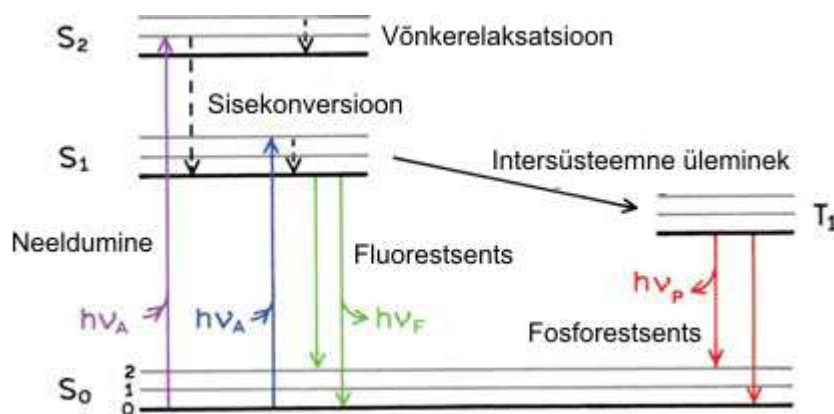
UV-Vis – ultravioletne ja nähtav elektromagnetkiirgus

### 3. Kirjanduse ülevaade

#### 3.1. Fotoluminestsents

Luminestsentsiks nimetatakse protsesse, mille korral ergastatud olekusse viidud molekulid kiirgavad energiat footonitena. Fotoluminestsents on luminestsentsi alaliik, mille korral molekulid ergastuvad ultraviolet-. (UV) või valguskiirgusega (Vis) kiiritades. Fotoluminestsents liigitatakse elektronolekute ja energia kiirgumise mehhanismi alusel fluorestsentsiks ja fosforestsentsiks [1].

Fluorestsents on molekulide omadus neelatud valgusfootonite toimel ergastuda kõrgema energiaga singletsesse olekusse ja relakseerudes tagasi põhiolekusse, kiirata valguskvant, mille energia on madalam kui neelatud valgusfootonil. Fluorestsentsi toimumisel saab eristada mitmeid protsesse, mille toimumise kiirused erinevad üksteisest mitme suurusjärgu võrra. Valguse neelamisel ja kiirgumisel toimuvaid protsesse saab kirjeldada Jablonski diagrammi abil (joonis 1) [2].



**Joonis 1.** Jablonski diagramm [3]. Singleti elektronolekud on tähistatud kui S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> ja S<sub>2</sub> ning tripleti elektronoleku tähisteks on T<sub>1</sub>. Horisontaalsed jooned tähistavad elektronide vibratsioonilisi energiatasemeid. Molekul ergastatakse põhiolekust S<sub>0</sub> kõrgematele energianivooale, kust molekul relakseerub liigset soojust vabastades S<sub>1</sub> alumisele nivooale. Fluorestsentsiks nimetatakse valguskiirgust, mis eraldub molekuli relakseerumisel S<sub>1</sub> olekust põhiolekusse. Fosforestsentsiks nimetatakse valguskiirgust, mis eraldub, kui molekul relakseerub T<sub>1</sub> olekust põhiolekusse. Joonis on esitatud muudetud kujul.

Toatemperatuuril on elektronid molekulis oma põhiolekus S<sub>0</sub>, kus vibratsiooniline energia on kõige madalam ja elektronide spinnid on vastassuunalised. Valguse neelamisel ergastub fluorofoor (fluorestseeruv molekul) kõrgematele vibratsioonilistele energiatasemetele S<sub>1</sub> ja S<sub>2</sub> energianivooale. Kasha reegli kohaselt relakseerub molekul nendest olekutest S<sub>1</sub> oleku madalaimale vibratsioonilisele energiatasemele, millelt toimub fluorestsentsi kiirgumine [4]. Relaksatsiooni S<sub>2</sub> → S<sub>1</sub> nimetatakse sisekonversiooniks ja see toimib pikosekundite jooksul. Kuna fluorestsents on sisekonversioonist umbes kolm

suurusjärku aeglasem protsess, siis enamik fluorestsentsist lähtub  $S_1$  olekust. Naastes  $S_1$  olekust põhiolekusse  $S_0$ , kiirgab fluorofoor footoneid, mis ongi fluorestsentskiirgus [3].

Kui võrrelda fluorofoori emissioonispektrit ergastusspektriga, siis on näha, et see ei ole kogu neeldumisspektri peegelpilt, vaid on ülemineku  $S_0 \rightarrow S_1$  peeglpilt. Franck-Condoni printsiibi kohaselt toimub footonite neeldumine võrreldes molekulisisesse tuumade asetuse muutumisega palju kiiremini. Kasha reegel seletab ära ka emissioonispektri sõltumatuse ergastuse lainepikkusest [5].

Võnkerelaksatsiooni ja sisekonversiooni käigus on molekul kaotanud energiat soojusena ja seetõttu on kiiratud footonid väiksema energiaga ning suurema lainepikkusega. Sellist emiteeritud kiirguse liikumist suurema lainepikkuse poole nimetatakse selle avastaja järgi Stokesi nihkeks [5].

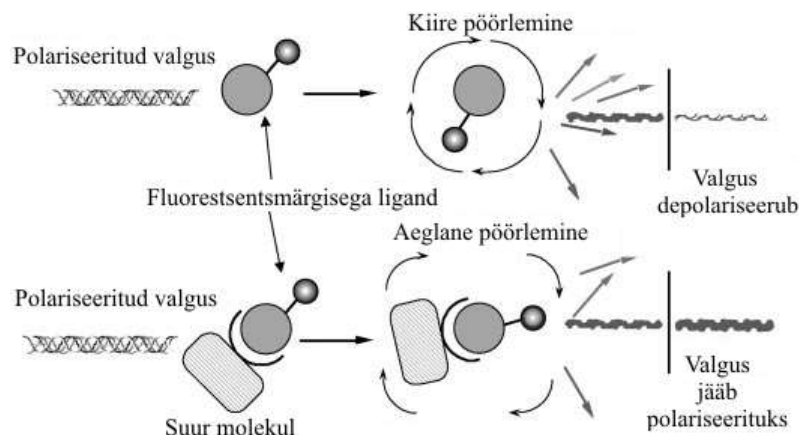
Fluorofooride tähtsateks omadusteks on kvantsaagis ja fluorestsentsi eluiga. Kvantsaagis näitab kiiratud ja neelatud footonite suhet ja seega näitab see fluorestsentsi protsessi efektiivsust. Suurem kvantsaagis tähendab suuremat fluorestsentskiirguse efektiivsust. Fluorestsentsi intensiivsus kahaneb pärast ergastust eksponentsiaalselt ning selle hääbumise kiiruskonstandi pöördväärtust nimetatakse fluorestsentsi elueaks. Fluorestsentsi eluiga iseloomustab aega, mille jooksul on elektronid ergastatud olekus. Eluiga määrab aja, mille jooksul saab ergastatud fluorofoor interakteeruda keskkonnaga [6].

$S_1$  olekus oleva molekuli elektroni spinn saab muuta oma suunda ehk saab toimuda intersüsteemne üleminek, mille tulemusel läheb molekul singletsest olekust tripletsesse olekusse. Tripletses ergastatud olekust footoni kiirgumist ja elektroni relakseerumist singletsesse põhiolekusse nimetatakse fosforestsentsiks ja molekuli, mis sellist kiirgust emiteerib nimetatakse fosfooriks. Kuigi klassikalise mehaanika kohaselt on selline üleminek keelatud, siis kvantmehaanika reeglid siiski lubavad seda üleminekut. Kuna spinni muutus on kineetiliselt takistatud, siis on fosforestsentsi protsess küllalt aeglane ja selliste fosfooride fosforestsentsi eluiga on mikrosekunditest sekunditeni [7].

### **3.1.1. Fluorestsentsi anisotroopia**

Fluorestsentsi anisotroopia (FA) meetodid mõõdavad fluorestsentsi depolariseeritust. FA sõltub fluorofoori ja sellega seondunud molekulide molekulmassidest, molekulide kujust ja keskkonna viskoossusest [8]. Käesolevas töös on FA-l põhinevat meetodit kasutatud fluorofooriga märgistatud aine valguga seondumise iseloomustamiseks. Kui ergastada väikest fluorofoori molekuli, mis pöörleb lahuses kiiresti, polariseeritud valgusega, siis tema poolt

emiteeritud valgus on tugevalt depolariseeritud, kuna algselt neelatud footoni ja kiiratud footoni tasapinnad on molekuli kiire pöörlemise tõttu erinevad. Kui väike molekul on mõne suurema molekuli, näiteks valgu, küljes, mis pöörleb aeglasemalt, siis footonite tasapinnad erinevad vähem ja kiiratud valgus jääb valdavalt polariseerituks (joonis 2).



**Joonis 2.** FAI põhinev katsesüsteem [9]. Joonis on esitatud muudetud kujul.

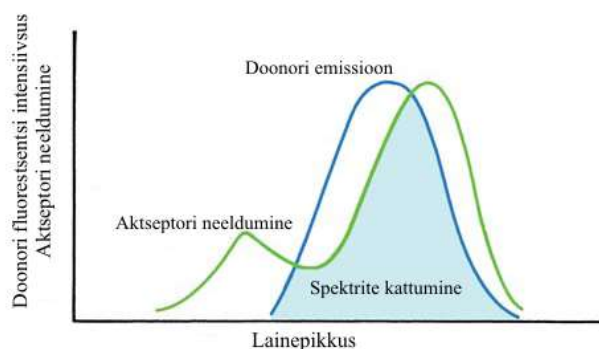
### 3.1.2. Försteri resonantsenergia ülekanne

Ergastatud olekus saab toimuda ka Försteri resonantsenergia ülekanne (FRET, *Förster- resonance-energy transfer*, ingl.k) teisele kromofoorile. FRETi toimumiseks on vajalik ergastatud olekus oleva doonorfluorofoori emissioonispektri ja põhiolekus oleva aktseptorkromofoori neeldumispiktri kattumine (joonis 3), osalevate kromofooride piisav lähedus ning sobiv dipoolide omavaheline nurk. Aktseptoriks olev kromofoor ei pea olema fluorestseeruv. Kui aktseptor on fluorestseeruv, siis doonori kiiritamisel emiteerib aktseptor fluorestsentskiirgust. Kui aktseptor on mittefluorestseeruv, siis ülekantud energia vabaneb soojuslikult. FRETi korral ei kanta energiat footonite kaudu ja seega on FRET mittekiirguslik [10].

Ülekantav energiahulk sõltub spektrite kattumise ulatusest ja väga tugevalt molekulide omavahelisest kaugusest (võrrand 1):

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (\text{võrrand 1}),$$

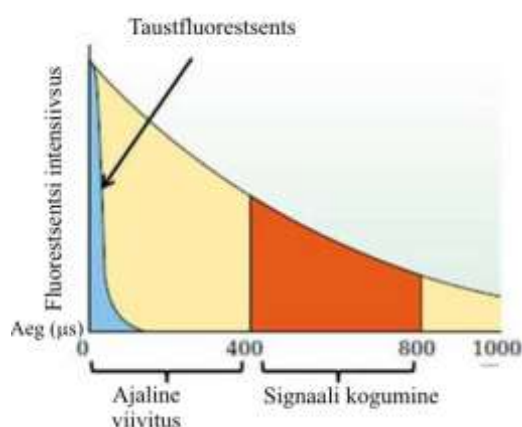
kus  $k_T(r)$  on ülekantud energiahulk,  $\tau_D$  on doonori eluiga aktseptori puudumisel,  $R_0$  on Försteri distant (vahekaugus),  $r$  on doonori ja aktseptori vahekaugus. Seega iga tegur, mis mõjutab kaugust doonori ja aktseptori vahel, mõjutab FRETi. Kaugust doonori ja aktseptori vahel, mille korral RETi (resonantsenergia ülekanne, *Resonance energy transfer*, ingl.k) efektiivsus on 50%, nimetatakse Försteri distantiks. Försteri distantid jäävad üldjuhul vahemikku 2 – 9 nm [10].



**Joonis 3.** Doonori ja aktseptori spektrite kattumine [11]. Joonis on esitatud muudetud kujul.

### 3.1.3. Aegviivitusega luminesentsi mõõtmine

Aegviivitusega luminesentsi mõõtmismeetodite korral ergastatakse proovi UV-Vis kiirgusega, aga signaali mõõtmist ei alustata kohe, vaid pärast teatud aja möödumist (joonis 4). Sellise viivituse kasutamine vähendab taustfluorestsentsi, näiteks rakkude autofluorestsentsi mõju [12]. Aegviivitusega luminesentsi (*time-gated luminescence*, ingl. k) mõõtmistehnikaid kasutatakse valdavalt selliste luminofooride korral, mille luminesentsi eluiga on suhteliselt pikk ja ületab oma kestuselt fluorestsentsi eluea. Sellisteks luminofoorideks on näiteks lantaniidide ioone või iriidiumi, rubiidiumi, plaatina või pallaadiumi sisaldavad kompleksid [13], [14]. Tartu Ülikooli keemia instituudis Asko Uri uurimisrühmas on välja arendatud ka orgaanilised ühendid, millele on kompleksis teatud proteiinkinaasidega toatemperatuuril ja vesilahuses omane pikaajaline fotoluminesents [15].



**Joonis 4.** Aegviivitusega luminesentsi mõõtmise põhimõte [16]. Joonis on esitatud muudetud kujul.



### 3.1.4. Luminestsentsi kustutamine

Luminestsentsi kustutamiseks (*luminescence quenching*, ingl.k.) nimetatakse protsesse, mille korral deaktiveeritakse fluorofoori ergastatud olek. Osakesi, mis kokkupuutel fluorofooriga vähendavad fluorestsentskiirguse intensiivsust, nimetatakse fluorestsentsi kustutajateks. Nendeks võivad olla näiteks erinevad orgaanilised molekulid, ioonid, kompleksid ja elektronid [17]. Kustutamise mehhanisme saab üldiselt jagada dünaamilisteks ja staatilisteks vastavalt sellele, kas fluorofoori ja kustutaja kokkupuude toimub fluorofoori ergastatud oleku või põhioleku ajal. Luminestsentsi kustutamise mehhanismideks on näiteks FRET [18], Dexteri elektronvahetus (DET, *Dexter electron transfer*, ingl.k) [19] ja fotoindutseeritud elektronülekanne [20] (PET, *Photoinduced electron transfer*, ingl.k). Kustutamise toimumiseks peab fluorofoori ja kustutaja omavaheline kaugus olema piisavalt väike, et nende elektronpilved omavahel kattuksid. Kustutamine saab esineda ka kovalentselt seotud fluorofoor-kustutaja paari vahel. Sel juhul on tegu intramolekulaarse kustutamisega [18].

Tavaliselt toimub kustutamine ilma fotokeemiliste reaktsioonideta, kustutamise käigus vabanenud energia eraldub soojusena. Fluorofooriga võib aga toimuda ka keemiline protsess, mida nimetatakse fotopleekumiseks (edaspidi lihtsalt pleekumine). Selle tagajärjel kaob pöördumatult fluorofoori võime ergastuda [21].

#### 3.1.4.1. Dünaamiline kustutamine

Dünaamiline kustutamine saab toimuda nii lahuses [22] kui ka tahkes olekus [22] ja gaasi faasis [23]. Kõigil juhtudel juhul difundeerub kustutaja läbi vastava keskkonna osakeste ja interakteerub siis ergastatud olekus oleva fluorofooriga. Kahe molekuli kokkupuutel toimuvad uued protsessid, mille tagajärjel võib fluorofoor naasta  $S_0$  olekusse, ilma footonit kiirgamata. Nende protsesside toimumise võimalikkus sõltub sellest, kui kiiresti saab kustutaja läbi keskkonna osakeste difundeeruda ja puutuda kokku fluorofooriga.

Dünaamilise kustutamise kirjeldamiseks kasutatakse Stern-Volmeri võrrandit:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{võrrand 2})$$

$$K_{SV} = k_q \tau_0 \quad (\text{võrrand 3}),$$

kus  $k_q$  on bimolekulaarne kustutamise konstant (näitab kustutamise efektiivsust või fluorofoori kättesaadavust kustutajale),  $F_0$  ja  $F$  on fluorestsentsi intensiivsused vastavalt kustutaja puudumisel ja olemasolul,  $\tau_0$  on fluorofoori eluiga kustutaja puudumisel,  $Q$  on kustutaja kontsentratsioon ja  $K_{SV}$  on Stern-Volmeri kustutamise konstant [24].

Kustutamise eksperimentides saadud katseandmeid eelistatakse kanda  $F_0/F$  vs  $[Q]$  graafikule, kuna eeldatakse, et kustutamine sõltub võrdeliselt kustutaja kontsentratsioonist (joonis 5). Lineaarne graafik ei tähenda aga seda, et dünaamiline kustutamine on üldse toimunud, kuna ka staatilise kustutamise korral kirjeldab  $F_0/F$  vs  $[Q]$  sõltuvust sirge. Sirgekujuline Stern-Volmeri graafik näitab samas ära selle, et konkreetsel juhul on tegemist tõenäoliselt ainult ühe kustutamise mehhanismiga [25].

Kuna dünaamiline kustutamine mõjutab ergastatud olekus olevaid fluorofoore, siis selle tulemusena fluorofooride eluead kahanevad ja fluorestsentsi intensiivsuse vähenemine on kirjeldatav võrrandiga 4:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (\text{võrrand 4}),$$

kus  $F_0$ ,  $F$  on fluorestsentskiirguse intensiivsused vastavalt kustutaja puudumisel ja olemasolul ning  $\tau_0$ ,  $\tau$  on fluorofoori eluead vastavalt kustutaja puudumisel ja olemasolul.

### 3.1.4.2. Staatiline kustutamine

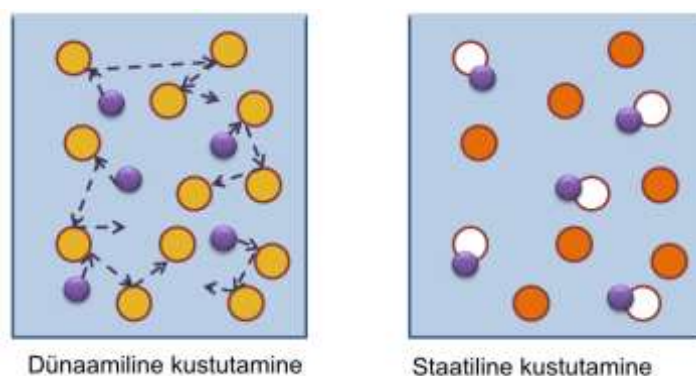
Kustutamine saab toimuda ka siis, kui moodustub mittefluorestseeruv (või nõrgalt fluorestseeruv) kompleks fluorofoori ja kustutaja vahel [25]. Kui selline kompleks neelab valgust, siis naaseb see ilma footoni kiirgumiseta (või väiksema kvantsaagisega) kohe tagasi põhiolekusse. Fluorestsentskiirguse vähenemise määr sõltub sel juhul kustutaja kontsentratsioonist ning fluorofoori ja kustutaja omavahelise sideme tugevusest (võrrand 5):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_a[Q] \quad (\text{võrrand 5}),$$

kus  $F_0$ ,  $F$  on fluorestsentskiirguse intensiivsused vastavalt kustutaja puudumisel ja olemasolul;  $K_a$  on assotsiatsiooni konstant;  $Q$  on kustutaja kontsentratsioon.

$F_0/F$  sõltuvus kontsentratsioonist on samamoodi nagu dünaamilise kustutamise korral lineaarne (joonis 5).

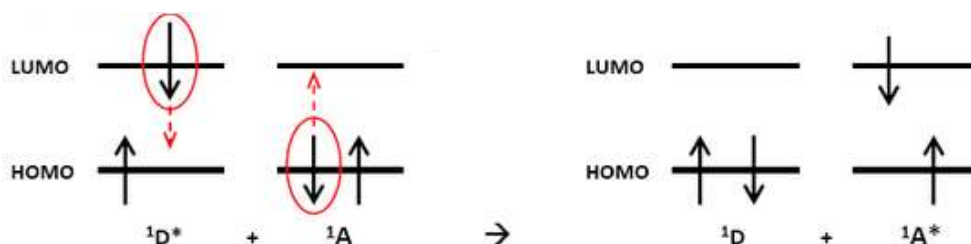
Staatilise kustutamise korral on komplekseerunud fluorofoorid mittefluorestseeruvad ja vaadeldav fluorestsents pärineb seega ainult komplekseerumata fluorofooridelt. Seega ei mõjuta staatiline kustutamine fluorofoori eluigasid, vaid vähendab ainult fluorestsentsi intensiivsust [25].



**Joonis 5.** Dünaamilise ja staatilise kustutamise võrdlus. Sinise ringiga on tähistatud kustutaja. Dünaamilise kustutamise korral suurendab suurem kustutaja kontsentratsioon kokkupõrgete tõenäosust. Staatilise kustutamise korral suurendab suurem kustutaja kontsentratsioon sidumise tõenäosust. Joonis on esitatud muudetud kujul [26].

### 3.1.4.3. Kustutamine FRETi ja Dexteri mehhanismide kaudu

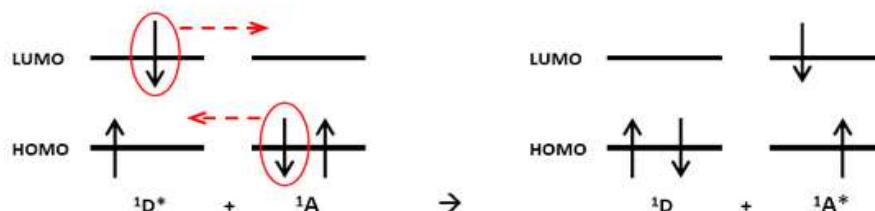
FRETi puhul toimub energia ülekanne doonorfluorofoorilt akseptorile. FRETi toimumiseks peavad kattuma doonori emissioonispekter ja aktseptori neeldumisspekter ehk nende elektronide energiatasemed peavad omavahel kattuma. Põhiolekus oleval doonorfluorofooril on 2 elektroni HOMO (*Highest unoccupied molecular orbital*, ingl.k) orbitaalil, doonori ergastumisel läheb üks selle elektron LUMO (*Lowest unoccupied molecular orbital*, ingl.k) orbitaalile. Kui toimub FRET, siis doonori LUMO orbitaalil paiknev elektron naaseb HOMO orbitaalile ja energia kantakse üle aktseptormolekulile. Ülekantud energia viib aktseptori elektroni kõrgema energiaga orbitaalile (joonis 6). Kui aktseptor on fluorestseeruv, siis võib ta kiirata fluorestsentskiirgust. Kui aktseptor on mittefluorestseeruv, siis ülekantud energia eraldub soojusena. Mõlemal juhul väheneb algselt ergastatud doonorfluorofoori fluorestsentskiirguse intensiivsus [27].



**Joonis 6.** FRET energiaülekande mehhanism. D tähistab doonorit ja A aktseptorit. HOMO tähistab kõrgeimat hõivatud molekuloorbitaali ja LUMO tähistab madalaimat hõivamata molekuloorbitaali. Joonis on esitatud muudetud kujul [28].

D Dexteri elektronvahetuse korral toimub elektronide vahetus doonori ja aktseptori vahel [29]. Selle toimumiseks peavad molekulide elektronide LUMO ja HOMO energiatasemed omavahel kattuma. Ergastatud doonoril on LUMO orbitaalil elektron, mis

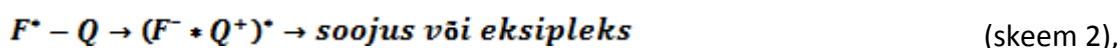
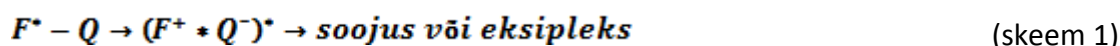
saab üle minna aktseptori LUMO orbitaalile. Kui see üleminek on toimunud, siis kantakse aktseptorilt elektron tagasi doonori HOMO orbitaalile. See elektron on aga pärit aktseptormolekuli HOMO orbitaalilt ja seetõttu jääb aktseptormolekul ergastatud olekusse ja doonormolekuli fluorestentsi intensiivsus väheneb ära antud energia tõttu (joonis 7). Kuna DETi efektiivsus sõltub väga tugevalt doonori ja aktseptori vahekaugusest, siis doonori ja aktseptori vahekaugus peaks DETi toimumiseks olema alla 1 nm [19]. Selleks, et saavutataks doonori ja aktseptori keskmine vahekaugus 0,65 nm, peaksid nende kontsentratsioonid jääma 1 M lähedusse. Kuna FRET toimub palju suuremal doonori-aktseptorpaari distantstil (2–9 nm), siis toimub see enne DETi ja seetõttu pole DET vaadeldav, kui doonor ja aktseptor pole omavahel kovalentselt seotud. DETi toimumine saab võimalikuks siis, kui on tegemist molekuliga, milles on kovalentselt seotud doonor ja aktseptor, ning esineb nende elektronide lainefunktsioonide kattuvus [19].



**Joonis 7.** Dexteri energiaülekanne mehhanism. D tähistab doonorit ja A aktseptorit. HOMO tähistab kõrgeimat hõivatud molekuloorbitaali ja LUMO tähistab madalaimat hõivamata molekuloorbitaali. Joonis on esitatud muudetud kujul [28].

#### 3.1.4.4. Kustutamine PET mehhanismi kaudu

PETi korral moodustub elektroni doonori, milleks on foto-ergastatud fluorofoor, ja elektroni aktseptori vahel kompleks, mida nimetatakse eksipleksiks. Selline kompleks võib naasta põhiolekusse footonit kiirgamata, aga mõnikord on vaadeldav ka selle kompleksi fluorestsents [30]. Ergastatud fluorofoor saab olla nii elektroni doonoriks (skeem 1) kui ka elektroni aktseptoriks (skeem 2) ja kustutaja on vastavalt elektroni aktseptoriks või elektroni doonoriks. PET-i mehhanismi kirjeldavad skeemid 1 ja 2:

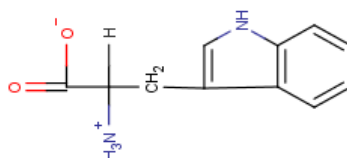


kus  $F^*$  on ergastatud fluorofoor ja  $Q$  on kustutaja.  $F^+$ ,  $Q^-$ ,  $F^-$  ja  $Q^+$  on fluorofoor ja kustutaja kompleksis ning plussmärk tähistab osakest, mis on elektroni kaotanud ja miinusmärk tähistab osakest, mis on elektroni liitnud.

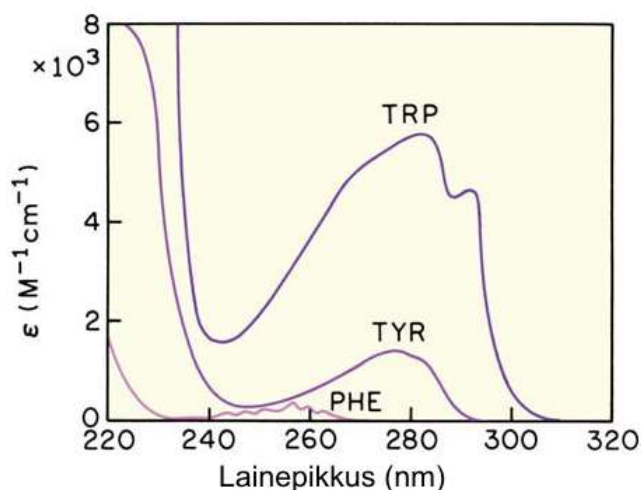
PET toimumise suund sõltub fluorofoori ja kustutaja redokspotentsiaalide väärtustest. Kuna PETi toimumiseks peavad elektronid liikuma ühelt molekulilt teisele, siis on sarnaselt DETile ka PETi toimumiseks vajalik suur kustutaja kontsentratsioon või doonori ja aktseptori kovalentne ühendamise. PETile on leitud mitmeid rakendusi nagu makromolekulide konformatsiooni uurimine [20], malaaria diagnoosimine [31] ja nukleiinhapete tuvastamine molekulmajakatega (*molecular beacon*, ingl.k) [32], [33].

### 3.2. Trüptofaan

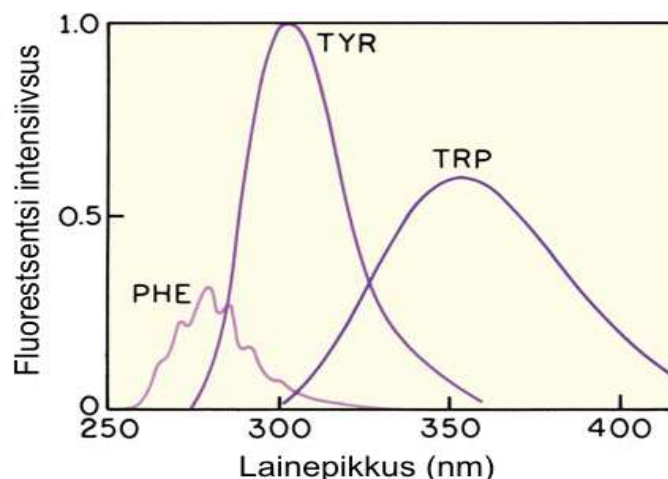
Trüptofaan (Trp) (joonis 8) on aromaatses külghelaga aminohape, mis neelab ja emitteerib valgust UV-piirkonnas. Valkudes esineb Trp-d keskmiselt 1,4 % (teisi aminohappeid esineb keskmiselt 5 %) [34], aga võrreldes teiste aromaatses aminohapetega, türosiiniga (Tyr) ja fenüülalaniiniga (Phe), on Trp-l tugevamad luminesentsomadused (joonised 9 ja 10) ja seetõttu on Trp peamiseks valkudes esinevaks fluorofooriks.



**Joonis 8.** Trüptofaani molekuli struktuur. Molekul on joonistatud programmis MarvinSketch 6.1



**Joonis 9.** Aromaatses aminohapete neeldumisspektrid vees pH 7.0 korral [24]. TRP – trüptofaan, TYR – türosiin, PHE – fenüülalaniin. Y-teljel tähistab  $\epsilon$  molaarset neeldumiskoefitsienti. Joonis on esitatud muudetud kujul.

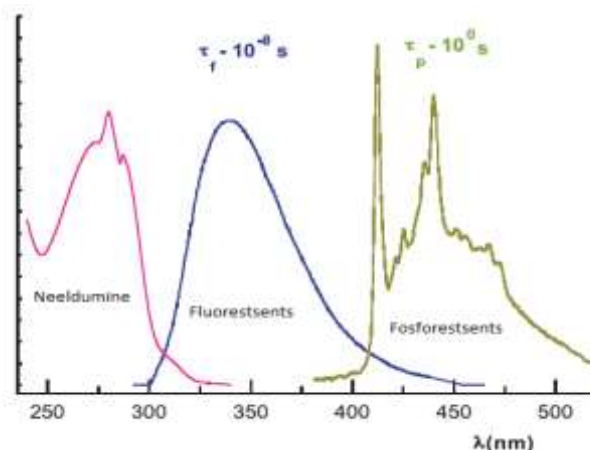


**Joonis 10.** Aromaatsete aminohapete emissioonispektrid vees pH 7.0 korral. Joonis on esitatud muudetud kujul.

### 3.2.1. Trüptofaani luminesentsomadused

Trüptofaani neeldumismaksimum neutraalsel pH-l on 280 nm juures ja sellele vastav neeldumiskoeffitsient on  $5560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [35]. Kui Trp-d ergastada UV-kiirgusega, siis saab Trp minna kahte isoenergeetilisse ergastatud olekusse  $^1L_a$  ja  $^1L_b$  [36]. Trp emissioon võib toimuda mõlemast olekust, aga tavaliselt toimub vesilahuses oleva vaba Trp ja valkudes olevate Trp jääkide fluorestsentsi emissioon olekust  $^1L_a$ , mis vastab  $S_1$  olekule [37]. Vesilahuses esineb vaba Trp fluorestsents kahe elueaga: 0,50 ja 2,8 ns [38]. Valkudes võib eluigade varieeruvus olla sajakordne [39], seda põhjustab Trp-de erinev paljastumine ümbritsevale keskkonnale [39]. Trp multiekspponentsiaalset fluorestsentsi valkudes kirjeldatakse kõige sagedamini rotameeride mudeliga, mille kohaselt erinevad fluorestsentsi eluead on põhjendatavad rotameeridega, mille amino- ja karboksürühmade asetus indooliringi suhtes on erinev. Sellise mudeli kohaselt on Trp konformatsioon valgus põhiolekus ja ergastatud olekus samasugune. Mõnede uurijate saadud andmed ei ole aga rotameeride mudeliga hästi kirjeldatavad ja seetõttu ei ole nende arvates rotameeride mudeli kasutamine päris korrektne [40], [37].

Trp fosforestsentsi emissioonispekter jääb vahemikku umbes 400–500 nm (joonis 11). Toatemperatuuril vesilahuses on Trp fosforestsentsi eluiga ligikaudu 1 ms [41].



**Joonis 11.** Trüptofaani neeldumisspekter ning fluorestsentsi ja fosforestsentsi emissioonispektrid [42]. Joonis on esitatud muudetud kujul.

Kuna Trp ja seda sisaldavate molekulide luminesentsomadused sõltuvad Trp ümbritsevast keskkonnast [43], siis kasutatakse Trp fluorestsentsi muutusi valkude struktuuri muutuste jälgimiseks [44]. Valkudes olevad Trp-d saavad FRET-i mehhanismi järgi kanda energiat sobivatele doonoritele ja ka seda saab kasutada valkude interaktsioonide ja struktuuri uurimisel [45], [46].

### 3.2.2. Trüptofaan fluorestsentsi kustutajana

Trp on aromaadne aminohape, mis on peamiseks valkudes esinevaks fluorofooriks ja võrreldes teiste aminohapetega, suudab ta ka suuremal määral fluorofooride fluorestsentsi intensiivsust vähendada. Vaba Trp on kustutajaks mitmetele punast valgust neelavatele fluorofooridele nagu ATTO 665 ja ATTO 680, moodustades nendega nõrgalt fluorestseeruvaid komplekse, toimides seejuures staatilise kustutajana [47]. Kui aga Trp siduda kovalentselt fluorofoori külge, siis võib ta selle fluorestsentsi kustutada ka elektronülekande mehhanismide kaudu [47], [28]. Trp võib ainsa aminohappena kustutada fluorooride fluorestsentsi ka PETi mehhanismi kaudu [20].

### 3.3. Proteiinkinaasid

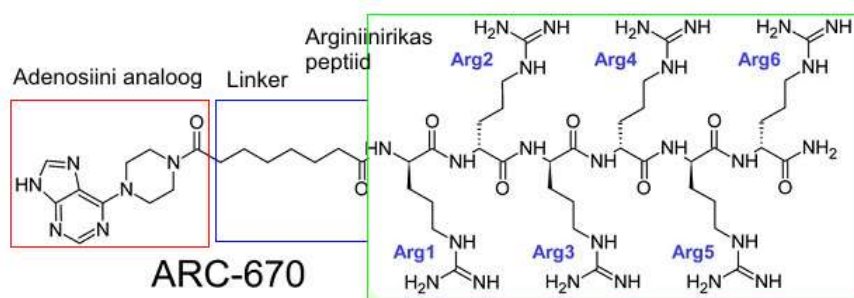
Ensüümid on valgud, mis katalüüsivad keemilisi reaktsioone. Nende aktiivsuse regulatsiooni kaudu saab omakorda mõjutada rakkude kasvu ja arengut. Valkude aktiivsust reguleeritakse mitmete posttranslatoorsete modifikatsioonide abil, millest üks olulisemaid on valkude fosforüülimine. Seda reaktsiooni reguleerivad proteiinkinaasid [48], [49], mis katalüüsivad  $\gamma$ -fosforüülrühma ülekannet nukleosiidtrifosfaadilt (peamiselt adenosiin-5'-trifosfaadilt ehk ATP-lt) valgu seriini, treoniini ja trüptofaani jääkidele. Nende ensüümide



normaalsest tasemest erinev aktiivsus võib põhjustada mitmeid tõsiseid haigusi nagu vähk, Alzheimeri tõbi ja diabeet [50]–[52]. Nende haiguste ravimiseks on viimastel aastakümnetel aktiivselt uuritud proteiinkinaaside funktsioneerimise seaduspärasusi ja arendatud aineid, mis võimaldavad taastada proteiinkinaaside normaalse talitluse [53].

### 3.4. ARC-tüüpi inhibiitorid

ARC-d on adenosini analoogi ja oligoarginiini konjugaadid, mille baasil on Tartu Ülikooli keemia instituudis Asko Uri uurimisrühmas välja arendatud kõrgafiinsed bisubstraatsed proteiinkinaaside inhibiitorid [54], [55]. ARC-tüüpi inhibiitorid seonduvad põhiliselt AGC-rühma kuuluvatele proteiinkinaasidele [56]. ARC-d koosnevad kahest fragmendist: adenosini analoogist ja arginiinirikast peptiidist ning neid ühendavast linkerist [54] (joonis 12). ARC-d seostuvad kinaasi mõlemasse substraati siduvasse piirkonda: ATP- ja peptiiditaskusse [57]. See annab rohkem füüsikalisi-keemilisi interaktsioone ensüümi ja inhibiitori vahel ja seetõttu on ARC-d afiinsemad kui ühesubstraatsed inhibiitorid [55]. Oligoarginiini osa tõttu läbivad ARC-tüüpi inhibiitorid rakkude plasmamembraani ning on kasutatavad kinaaside funktsioonide uurimiseks elusates rakkudes. Kuna mõnedes ARC-ühendites sisalduvad kõik aminohapped omavad D-konfiguratsiooni, on need konjugaadid väga püsivad proteolüütilise lagundamise suhtes ning seetõttu hästi kasutatavad rakukatsetes [58]. ARC-tüüpi inhibiitoreid on märgistatavad fluorestsentsvärviga (ARC-tüüpi sondid) ja selliseid fotoluminestsents-sonde saab kasutada kinaaside ja kinaaside inhibiitorite uurimiseks fluorestsentsil põhinevate meetodite, näiteks fluorestsentsanisotroopia ja fluorestsentsmikroskoopia abil [15], [59].



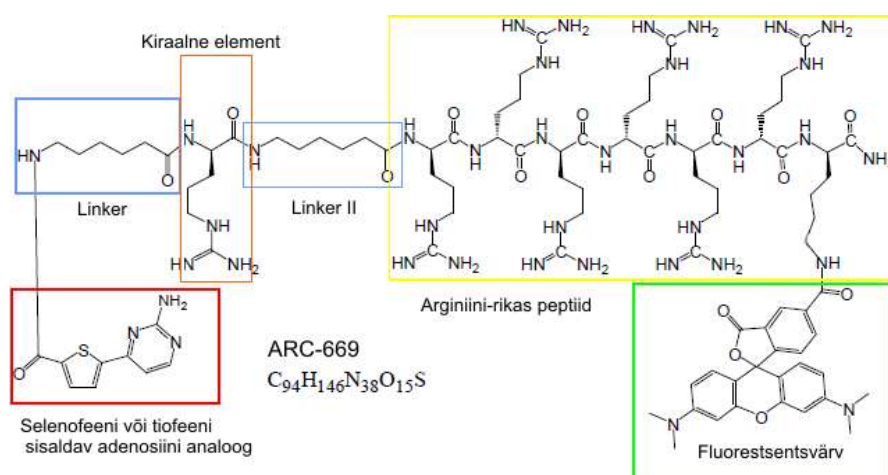
**Joonis 12.** ARC- tüüpi inhibiitori struktuur ARC-670 näitel [60]. Joonis on esitatud muudetud kujul.

#### 3.4.1. ARC-Lum sondid

ARC-Lum sondid on ARC-d, mille adenosini jälgendav fragment sisaldab tiofeeni või selenofeeni (joonis 13). ARC-Lum sondid jagatakse vastavalt nende struktuurile kaheks: ARC-Lum(Fluo) sondid ja ARC-Lum(-) sondid. ARC-Lum(Fluo) sondide struktuuris on

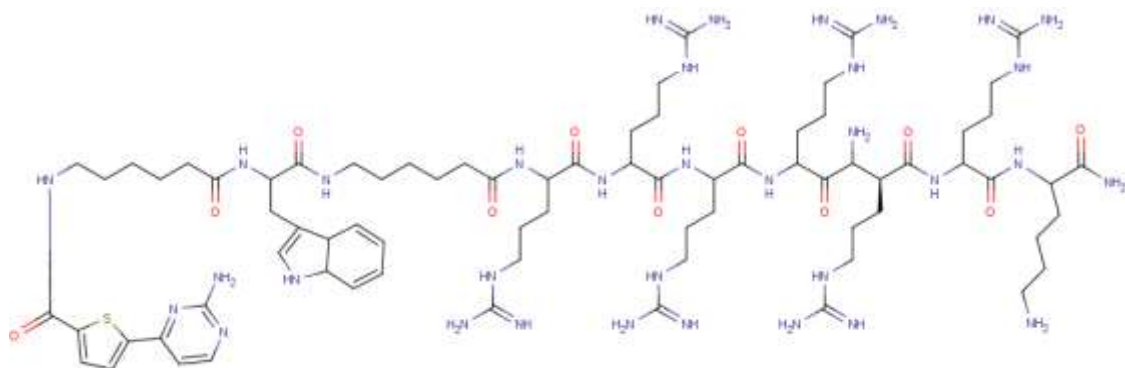


kaks fotoluminestsentsi evivat komponenti: tiofeeni või selenofeeni sisaldav adenosiini jäljendav fragment (doonor) ja lisaks veel fluorestsentsvärv (aktseptor), mis tavaliselt on konjugeeritud peptiidiahela karboksüterminaalsesse otsa. ARC-Lum(-) sondide struktuuris on ainult doonor. ARC-Lum sondide iseloomulikuks omaduseks on, et seondumisel proteiinkinaasidega tekib pika elueaga (19–266 µs) fotoluminestsents: ergastades doonorit valgusega lähis-UV alas, emiteerib aktseptor pika elueaga valgust spektri punases alas. Vabal, seondumata ARC-Lum(Fluo) sondil vesilahuses selliseid omadusi ei ole [15]. ARC-Lum(-) sondid fosforestseeruvad seondumata kujul vaid hapnikuvabas keskkonnas (avaldamata andmed) .

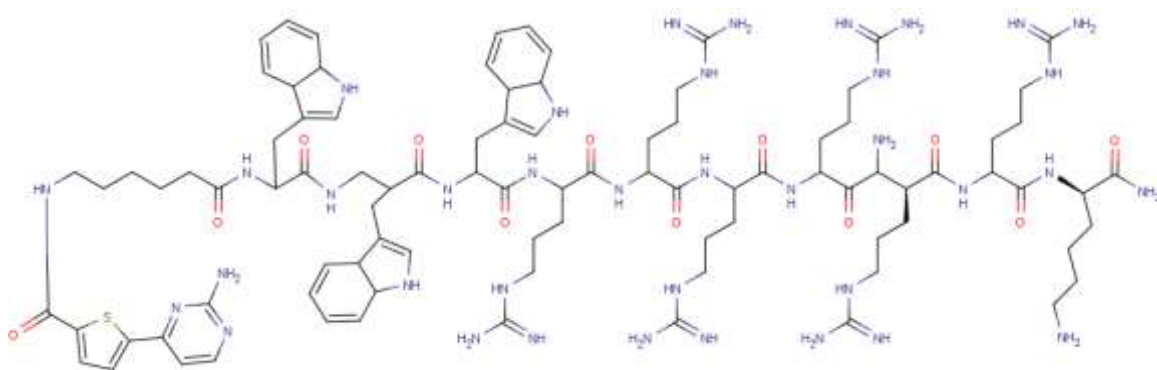


**Joonis 13.** ARC-Lum(Fluo) sondi struktuur ARC-669 näitel [61]. Siin on toodud ARC-669 struktuur, milles on tiofeeni sisaldav adenosiini analoog ja mis on märgistatud 5-TAMRA fluorestsentsvärviga. ARC-Lum(-) sondil struktuuris peptiid-seotud fluorestsentsvärv puudub. Joonis on esitatud muudetud kujul.

Antud bakalaaurusetöös uuriti ARC-Lum(-) sonde, millel linker hõlmab kas ühe (joonis 14) või kolm trüptofaani jääki (joonis 15). Nende sondide struktuuris olev Trp võib olla FRETi doonoriks adenosiini analoogile, kuna Trp emissioonispekter ja ARC-Lum(-) sondi neeldumispekter kattuvad osaliselt omavahel.



**Joonis 14.** ARC-Lum(-) sondi ARC-1427 struktuur. Lihtsuse mõttes on struktuur puhastamata (mõned sidemete pikkused ei ole korrektsed. Molekul joonistati programmiga MarvinSketch 6.1



**Joonis 15.** ARC-Lum(-) sondi ARC-1428 struktuur. Lihtsuse mõttes on struktuur puhastamata (mõned sidemete pikkused ei ole korrektsed. Molekul joonistati programmiga MarvinSketch 6.1

## 4. Eksperimentaalne osa

### 4.1. Kasutatud kemikaalid

Veise seerumi albumiin (BSA, tootekood A4503), DL-ditiotreitol (DTT, tootekood D9779) osteti firmast Sigma-Aldrich, trüptofaan (Trp, tootekood E-2500) osteti firmast Bachem. Dulbecco' fosfaat-puhverdatud soolalahus (DPBS, pH = 7,4) osteti firmast Naxo. ARC-Lum(-) sondid ARC-668, ARC-1427 ja ARC-1428 sünteesiti Tartu Ülikooli keemia instituudis Asko Uri uurimisrühmas.

### 4.2. Trüptofaani molaarse neeldumiskoeffitsendi määramine

Trüptofaani molaarse neeldumiskoeffitsendi määramiseks kasutati UV-Vis spektroskoopiat. Mõõtmine teostati spektrofotomeetriga Unicam UV 300 (Thermo Scientific). Trüptofaani neeldumist mõõdeti PBSi lahuse suhtes, kuna just selles lahuses mõõdeti hiljem ka ARC-Lum(-) sondide fluorestsentspektreid. Scott Prahli veebilehe põhjal [35] võeti algseks Trp molaarseks neeldumiskoeffitsendiks  $\epsilon_{280} = 5579 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ja sellest lähtudes valmistati 3 Trp lahust 250 ml mõõtkolbi, mille optiline tihedus oleks ligikaudu 0,8. Lainepikkuste vahemikuks võeti 275–285 nm, pilu laiuseks määrati 2 nm, skanneerimise kiiruseks 30 nm/min ja mõõtmisintervalliks 1 nm. Igat lahust mõõdeti 3 tsüklit. Trp lahuse neeldumisest lahutati maha PBSi neeldumine. Kolme lahuse keskmine neeldumiskoeffitsent määrati Lambert–Beeri seaduse (võrrand 6) järgi;

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

(võrrand 6),

kus  $\epsilon$  on molaarne neeldumiskoeffitsent,  $A$  on lahuse optiline tihedus,  $c$  on lahuse kontsentratsioon ja  $l$  on lahusekihi paksus sentimeetrites.

### 4.3. Trüptofaani ja ARC-Lum(-) sondide neeldumisspektrite mõõtmine

UV-Vis neeldumisspektrid mõõdeti spektrofotomeetriga Unicam UV 300 (Thermo Scientific) ja lahuste kontsentratsioone määrati tilgaspektrometriga NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Lahused valmistati Eppendorf tuubidesse ja nende neeldumist mõõdeti 10 mm teepikkusega kvartsküvetis (Beckman Coulter).

Trüptofaanist ja ARC-Lum(-) sondidest ARC-668, ARC-1427 ja ARC-1428 valmistati PBS-puhvrissse sellise kontsentratsiooniga lahused, et nende optiline tihedus oleks ligikaudu 0,15. Alglahuste, millest tehti lahjendused, kontsentratsioon määrati tilgaspektrometriga Nanodrop 2000c. Spektreid mõõdeti lainepikkuste vahemikus 200–700

nm, pilu laiuks määrati 2 nm, skanneerimiskiiruseks määrati vastavalt neeldumisele automaatselt muutuv kiirus ja mõõtmisintervalliks 2 nm. Mõõdeti 3 tsükli, keskmistati 3 tsükli neeldumised ja ainete spektritest lahutati maha PBSi neelduvus. Andmete töötlemisel jäeti välja neeldumine vahemikus 200 – 248 nm.

#### **4.4. Fluorestsentspektrite mõõtmine ja töötlemine**

ARC-Lum(-) sondide ARC-668, ARC-1427 ja ARC-1428 ning trüptofaani fluorestsentsi ergastus- ja emissioonispektrid mõõdeti spektrof fluoromeetriga Fluoromax-4P (HORIBA Jobin Yvon) nii tavapärases puhverlahuses (PBS, 0,005% Tween<sup>®</sup> 20) kui ka PKAc või BSA juureolekul. Proovide käsitlemiseks kasutati kvartsist mikroküvette (Perkin Elmer, tootekood B0631124). Lahused valmistati PBS-puhvrissi ruumalaga 150 µL ja kontsentratsiooniga ligikaudu 1 µM. Enne PKAc lahuse valmistamist määrati fluorestsentsi anisotroopia meetodiga PKAc aktiivsus. Kõiki mõõtmistel kasutatavaid küvette hoiti enne mõõtmisi umbes 2 tundi kontsentreeritud lämmastikhappes ja pesti seejärel Milli-Q<sup>®</sup> veega. Mõõtmise alguses kontrolliti, et Fluoromax-4P monokromaatorid oleksid joondatud korrektselt. Enne mõõtmise alustamist kontrolliti ka küveti puhtust. Kui see polnud piisav, siis küveti pesti etanooliga ja loputati Milli-Q<sup>®</sup> veega, kuni ergastus- ja emissioonispektrites ei detekteeritud enam veele mitteomast signaali (Trp-le või sondile vastav signaal).

Esimesena mõõdeti PBSi spektrid ja seejärel vaba PKAc või BSA spektrid. PKAle või BSAlle lisati sellises kontsentratsioonis ARC-Lum(-) sondi, et lahuse ruumala sondi lisamisel oluliselt ei kasvaks. Pärast 10-minutilist inkubatsiooni mõõdeti moodustunud lahuse spektrid. Lõpuks mõõdeti vaba ARC-Lum(-) sondi spektrid. Enne iga uue lahuse mõõtmist pesti küvette ja kontrolliti ka nende puhtust. Kuna selline tegevus osutus kokkuvõttes väga aeganõudvaks, siis on sondide spektrid mõõdetud erinevatel päevadel.

Fluorestsentsi ergastusspektrid mõõdeti nii, et ühel juhul ergastati proovi lainepikkuste vahemikus 240 – 360 nm (pilu laius 0,5 nm) ja emissiooni mõõdeti lainepikkusel 380 nm (pilu laius 10 nm) ning teisel juhul oli ergastava valguse lainepikkuste vahemikuks 240 – 410 nm (pilu laius 0,5 nm) ja emissiooni mõõdeti lainepikkusel 440 nm (pilu laius 20 nm). Mõõtmisintervalliks oli mõlemal juhul 0,5 nm ja integreerimisaeg 0,5 s.

Fluorestsentsi emissioonispektrid mõõdeti nii, et ühel juhul ergastati proovi lainepikkusega 280 nm (pilu laius 5 nm) ja emissiooni mõõdeti vahemikus 290 - 540 nm (pilu laius 1 nm) ning teisel juhul oli ergastava valguse lainepikkuseks 340 nm (pilu laius 5 nm) ja

emissiooni mõõdeti vahemikus 360 - 650 nm juures (pilu laius 1 nm). Mõõtmisintervall oli mõlemal juhul 1 nm ning integreerimisaeg esimesel juhul oli 0,5 s ja teisel juhul 0,25 s. Pärast spektrite mõõtmist oli vaja veel saadud andmeid töödelda, nii et spektrid vastaksid olukorrale, kus kõigi ainete kontsentratsioon on 1  $\mu$ M.

Tulemuste analüüsimiseks kasutati programme Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) ja GraphPad Prism (versioon 5.02, Graphpad Software). Esimesena lahutati saadud spektritest maha taustsignaal ehk kasutatud puhvri signaal. Arvutuste tegemisel arvestati lahuste lisamisest tulenevaid kontsentratsioonide muutusi. Sondi ja PKAc kompleksi dissotsiatsioonikoefitsendi alusel eeldati, et kinaasi ja sondi vaheline afiinsus on piisav, et kogu sond oleks seotud kompleksi PKAc-ga ehk lahuses oleva vaba sondi hulk on võrreldes kompleksiga väga väike ja võib seega jätta arvestamata. Selleks, et näha, mis efektid tulenevad ARC-Lum(-) sondi ja valgu omavahelisest interaktsioonist, tuli sondi ja valgu lahusest maha lahutada valgu signaal, kusjuures arvestati seda, et valgu ja sondi omavahelisel interaktsioonil valgu fluorestsents väheneb. See valgu fluorestsentsi vähenemine arvutati välja andmetest, mis saadi, kui mõõdeti fluorestsentsi emissiooni ergastuslainepikkusega 280 nm. Leitud valgu signaali vähenemise kordsust kasutati ka teiste spektrite arvutuste juures. Tulemuseks saadi ARC-Lum(-) sondi fluorestsentsi muutus, mis tuleneb selle interaktsioonist valguga. Selleks, et teada saada, kui palju muutub ARC-Lum(-) sondi fluorestsentsi intensiivsus, kui see seondub valguga, võrreldi omavahel ainult puhvris ja valgu juuresolekul mõõdetud sondi emissioonispektrite alust pindala (ergastatav lainepikkus oli 340 nm ehk ergastati ainult ARC-Lum(-) sondi ja mitte valku).

#### 4.5. Trüptofaani ja ARC-Lum(-) sondi vahelise FRETi hindamine

Trüptofaani ja ARC-Lum(-) paari vahelise intramolekulaarse FRETi teoreetilise võimalikkuse hindamiseks mõõdeti trüptofaani ja ARC-1427 emissioonispektrid ning ARC-668 neeldumisspekter vastavalt peatükkides 3.3 ja 3.4 esitatud kirjeldusele. Mõõdetud spektrid normaliseeriti signaali maksimumi järgi ja arvutati nende spektrite omavahelise kattumise integraal ning kattumise põhjal Försteri distant. Arvutustel kasutati meetodit, kus Försteri distant si arvutamise võrrandid (võrrandid 7 ja 8) olid viidud programmi Igor Pro (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, OR) ja see programm oli omakorda viidud Exceli faili kujule [62], [63]. Selles programmis oli spektrite kattumise integraal väljendatud ühikus  $M^{-1} cm^{-1} nm^4$ . Kattuvuse arvutamiseks kasutati võrrandit 7 [64]:

$$I = \int F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (\text{võrrand 7}),$$

kus  $F_D$  on normaliseeritud doonori emissiooni intensiivsus,  $\varepsilon_A$  on aktseptori neeldumisspekter ühikutes  $M^{-1}cm^{-1}$  (antud töös arvutati see neeldumismaksimumi järgi normaliseeritud neeldumisspektrist, mis korrutati läbi neeldumiskoefitsendiga) ja  $\lambda$  on lainepikkus nanomeetrites.

Försteri distantsti arvutamiseks kasutati võrrandit 8 [64]:

$$R_0 = 0.02108[\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)]^{\frac{1}{6}} \quad (\text{võrrand 8}),$$

kus  $R_0$  tähistab kriitilist FRETi distantsti ehk Försteri distantsti,  $n$  näitab keskkonna murdumisindeksit,  $J$  on võrrandis 7 kirjeldatud spektrite kattumise integraal,  $Q_D$  on vaba doonori kvantsaagis ja  $\kappa^2$  on aktseptormolekuli ja doonormolekuli vaheline orientatsioonifaktor.  $\kappa^2$  väärtused võivad olla vahemikus 0-4 (sealhulgas 1 vastab antiparalleelsetele ja 4 paralleelsetele dipoolidele) ja tavaliselt võetakse selle väärtuseks 2/3, mis vastab dipoolide keskmistatud orientatsioonile [65].

Exceli faili sisestati normaliseeritud doonori emissioonispekter ja aktseptori normaliseeritud neeldumisspekter. Lisaks määrati teistele suurustele  $Q_D$ ,  $n$ ,  $\kappa^2$  ja  $\varepsilon$  väärtused vastavalt antud FRETi paarile ja katse tingimustele. Need väärtused olid trüptofaani ja ARC-668 korral järgmised:  $Q_{D(\text{trüptofaan})}=0,13$  (paraku on teadmata, mis võiks olla trüptofaani kvantsaagis, kui see on kovalentselt ARC-Lum(-) sondiga seotud, seetõttu kasutati vaba trüptofaani kvantsaagist;  $n_{\text{fosfaatpuhver, pH=7,4}}=1,333$  [66];  $\kappa^2=(2/3, 1, \text{ ja } 4)$  ja  $\varepsilon_{340, \text{ARC-668}}=15000 M^{-1}cm^{-1}$ . Nendest sisendandmetest arvutati kattuvusintegraal ja Försteri distantsid.

Edasi leiti ARC-1427 madalaima energiaga konformeer programmiga MarvinSketch 6.1 (molekuli vaadeldi solvendivabas keskkonnas) ja mõõdeti selle struktuuris oleva trüptofaani ja adenosiini jäljendava fragmendi aatomite vahelisi ligikaudseid distantse vabavaralise programmiga MarvinSpace (versioon 6.1.3), et hinnata, kui suure efektiivsusega FRET on teoreetiliselt võimalik. Minimaalse ja maksimaalse mõõdetud kauguse jaoks arvutati välja ka FRETi efektiivsused vastavalt võrrandile 9 [64]:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} * 100\% \quad (\text{võrrand 9}),$$

kus  $R_0^6$  tähendab doonori ja aktseptori paari Försteri distantsti astmel 6 ja  $r^6$  on konkreetne doonori ja aktseptori vaheline kaugus astmel 6 ning  $E$  on  $r$ -le vastav FRETi efektiivsus. FRETi efektiivsust saab mõõta ka suhtelise doonori fluorestsentsi emissiooni muutuse kaudu vastavalt võrrandile 10 [64]:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (\text{võrrand 10}),$$

kus  $F_{DA}$  tähistab doonori fluorestsentsi intensiivsust aktseptori juuresolekul ja  $F_D$  aktseptori puudumisel. Antud juhul mõõdeti vaba trüptofaani (doonori), ARC-668 (aktseptori) ja ARC-1427 (doonor koos aktseptoriga) fluorestsentsi emissioonispektrit, ergastades molekule lainepikkusel 280 nm.

#### 4.6. Aktiivse cAMP sõltuva proteiinkinaasi katalüütilise alaühiku kontsentratsiooni määramine

PKAc kontsentratsioon määrati enne fluorestsentsi spektrite mõõtmist ja enne väljatõrjumiskatseid ARC-Fluo sondiga ARC-1042 ( $K_D = 0,2$  nM). Mõõtmised teostati viiekomponendilises puhverlahuses (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,005% Tween20<sup>®</sup>, 0,5 mg/ml BSA, 5 mM DTT), mida on varem kasutatud ARC-1042  $K_D$  määramisel. Valmistati PKAc kolmekordne lahjendusseeria, alustades kontsentratsioonist 500 nM (12 punkti). Lahused valmistati 384 süvendiga vähesiduva pinnaga mikrotiiterplaadile (Corning, tootekood 3676). Kinaasi lahjendusseeriale lisati juurde ARC-1042 lahus lõppkontsentratsiooniga 20 nM. Mikroplaati termostateeriti enne mõõtmisi 10 min 30°C juures termostaadil THERMOstar (BMG Labtech). Lahuste anisotroopia väärtused mõõdeti 30°C juures mikrotiiterplaadilugejaga Pherastar (BMG labtech). Fluorestsentsi anisotroopia mõõdeti optilise mooduliga, kasutades ergastusfiltrit 540 nm, laiusega 50 nm ja emissioonifiltrit 590 nm, laiusega 50 nm. Detektori tundlikkus pandi paika selle süvendi järgi, milles oli ainult 20 nM ARC-1042 lahus ilma kinaasita. Saadud tulemusi analüüsiti programmiga Prism (versioon 5.02), kasutades PKAc aktiivsuse leidmiseks võrrandite süsteemi:

$$Z = \frac{L_t + K_d + k \cdot x - \sqrt{L_t + K_d + k \cdot x}}{2 \cdot L_t} \quad (\text{võrrand 11}),$$

$$M = \frac{Q \cdot Z}{1 + Z \cdot (Q - 1)} \quad (\text{võrrand 12}),$$

$$Y = (1 - M) \cdot A_f + M \cdot A_b \quad (\text{võrrand 13}),$$

kus  $A_f$  on vaba ligandi anisotroopia,  $A_b$  on täielikult seotud ligandi anisotroopia,  $L_t$  on ligandi summaarne kontsentratsioon,  $K_D$  on ligandi ja valgu kompleksi dissotsiatsioonikonstant,  $x$  on ensüümi summaarne kontsentratsioon,  $Y$  on mõõdetud anisotroopia,  $k$  on aktiivne ensüümi kontsentratsioon mitteaktiivse ensüümi suhtes,  $Q$  on seotud ja vaba ARCi fluorestsentsi intensiivsuste jagatis.

#### 4.7. ARC-Lum(-) sondi afiinsuse määramine PKAc suhtes

ARC-Lum(-) sondide ARC-1427 ja ARC-1428  $K_d$  määramiseks valmistati sellest mikrotiiterplaadile kolmekordne lahjendusserie alates kontsentratsioonidest vastavalt 9  $\mu\text{M}$  ja 7  $\mu\text{M}$ . Lahused valmistati fosfaatpuhvrise (pH= 7,4) mille koostises oli 5 mM DTT ja 0,005 % Tween20®. Sondi lahjendusseriele lisati lahus, milles PKAc ja ARC-Lum(Fluo) sondi ARC-1182 lõppkontsentratsioonid olid 1 nM. Enne lahuste mõõtmist termostateeriti mikroplaati 10 min 30°C juures. Fluorestsentsi anisotroopiat mõõdeti optilise mooduliga, kasutades ergastusfiltrit 590 nm, laiusega 50 nm ja emissioonifiltrit 675 nm, laiusega 50 nm. Aegviivitusega luminesstsentsi mõõdeti optilise mooduliga, kasutades ergastusfiltrit 337 nm ja emissioonifiltrit 675 nm. Ajaliseks viivituseks oli 50  $\mu\text{s}$  ja signaali koguti 150  $\mu\text{s}$  jooksul. Saadud tulemusi analüüsiti programmiga Prism (versioon 5.02), kus rakendati mittelineaarset regressiooni (võrrand 10):

$$Y = \text{Alumine platoo} + \frac{\text{Ülemine platoo} - \text{Alumine platoo}}{1 + 10^{(\text{LogIC50} - X) \cdot \text{Hilli Tõus}}} \quad (\text{võrrand 10}),$$

kus  $X$  on inhibiitori kontsentratsiooni logaritm,  $Y$  on mõõdetud fluorestsentsi anisotroopia või aegviivitusega luminesstsentsi intensiivsus, alumine ja ülemine platoo on vastavalt minimaalne ja maksimaalne fluorestsentsi anisotroopia või aegviivitusega luminesstsentsi intensiivsus,  $\text{logIC50}$  on inhibiitori kontsentratsioon, mille juures on saavutatud pool maksimaalsest efektist, Hill'i tõus (nimetatakse ka Hill'i koefitsendiks) on graafiku tõusu faktor (ühikuta suurus). Saadud IC50 väärtused sisestati veebikalkulaatorisse [67] ja arvutati ARC-1427, ARC-1428 ja nende PKAc kompleksi dissotsiatsioonikoefitsent  $K_d$ .



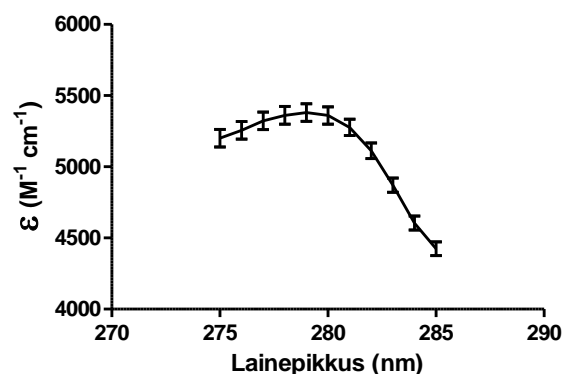
## 5. Tulemused ja arutelu

Töö eesmärgiks oli uurida ARC-Lum(-) sonde, mille struktuuris kahe linkeri või linkeri ja peptiidi vahele oli kovalentselt seotud trüptofaani jäägid (joonised 14 ja 15) ning selgitada fluorestsentsspektrite alusel, kas kirjeldatud asendis Trp ja tiofeeni sisaldava fragmendi vahel saab toimuda intramolekulaarne FRET ning kas selle FRET-i efektiivsus muutub ARC-Lum(-) sondi seondumisel kinaasile. Varasemalt pole Trp-ga ARC-Lum(-) sonde sünteesitud ega uuritud. Vajadus sellise uurimuse järele tekkis soovist suurendada ARC-Lum sondide kahefootonilist neeldumist. Trp näitel sooviti hinnata FRET-i võimalikkust, kui paigutada doonor kahe linkeri vahele. Lisaks taheti uurida valgu koostisesse kuuluvate Trp-de mõju ARC-Lum sondide fotoluminestsentsile.

### 5.1. Trüptofaani neeldumisspekter ja molaarne neeldumiskoeffitsient

Esmalt oli vajalik välja selgitada, millist puhvrit on antud katsesüsteemis võimalik kasutada. Üldiselt on ARC-tüüpi inhibiitoritega teostatud katsetes kasutatud HEPES puhvrit. Antud juhul selgus, et HEPES puhvri neeldumisspekter kattub osaliselt trüptofaani neeldumisspektriga ja seetõttu see katseteks sobiv ei olnud. Kui võrreldi Trp neeldumisspektrit vees ja PBS puhvris, siis selgus, et nendes keskkondades on ainete spektrid identsed ja seetõttu otsustati edasistes katsetes kasutada PBS puhvrit.

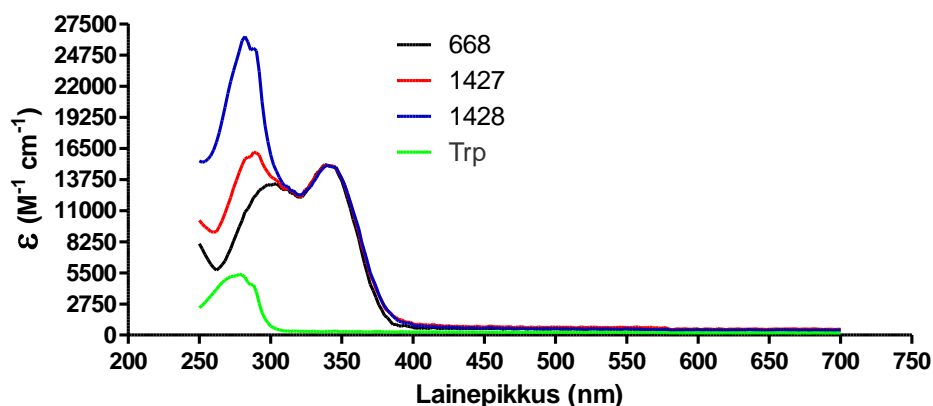
Trüptofaani molaarse neeldumiskoeffitsendi ( $\epsilon$ ) määramisel saadi lainepikkusel 278 nm selle väärtuseks  $5380 \pm 181 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (määramatus usaldusnivool 95%) (joonis 16), mis võrreldes kirjandusest leitud väärtusega  $\epsilon = 5579 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [35] on veidi väiksem.. Kirjanduses kasutati pilu laiust 1 nm, kuid antud töös kasutati pilu laiust 2 nm. Selline pilu laiuse valik oli tingitud vajadusest määrata neeldumiskoeffitsent samades tingimustes, mida hiljem kasutati lahjade proovide mõõtmisel. Kuna trüptofaani neeldumisspekter on maksimumi lähedal teravatipuline, näiteks 280 nm juures on neeldumiskoeffitsendiks määratud  $5431 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [35], siis on neeldumiskoeffitsendi määramine pilu laiusest mõjutatud. Erinevus võib olla tingitud ka aine kadudest kaalumisel ja lahuste valmistamisel. Edaspidises analüüsis kasutati siiski antud tingimustel määratud neeldumiskoeffitsendi väärtust.



**Joonis 16.** Trüptofaani neeldumiskoeffitsent vahemikus 275-285 nm (pH=7,4). Vearibad näitavad erinevate proovide mõõtmisel saadud neeldumiskoeffitsentide standardhälvet.

## 5.2. ARC-Lum(-) sondide neeldumisspektrid

ARC-Lum(-) sondide neeldumisspektrite analüüsil eeldati, et tiofeeni sisaldava adenosini jäljendava fragmendi neeldumismaksimumi väärtus ei muutu, kui siduda sellele kovalentselt trüptofaani jääk. Varasemalt on Asko Uri laboris kindlaks tehtud, et taoliste tiofeeni sisaldavate ühendite neeldumiskoeffitsent 340 nm juures on  $15\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Seda väärtust kasutades arvutati ARC-Lum(-) sondide neeldumiskoeffitsendid teistel lainepikkustel ja selgus, et 278 nm juures on neeldumine ühe Trp jäägi kohta ARC-Lum(-) sondi struktuuris võrreldes vaba trüptofaani molekuliga vähenenud: ARC-1427 neeldumiskoeffitsent 278 nm juures on  $4810\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ja ARC-1428 korral  $5180\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (joonis 17). Erinevus vabast Trp-st võib olla tingitud Trp lähikeskkonna omaduste muutustest [43]. Samas ei pruugi algne eeldus tiofeeni fragmendi neeldumismaksimumi väärtuse muutumatusest olla päris korrektne, kuna tiofeeni neeldumine võib olla mõjutatud sondi struktuuri lisatud trüptofaani(de)st. Üldiselt on leitud suurused lähedased vaba Trp neeldumisele ja spektrite kujust saab järeldada, et ARC-Lum(-) sondile lisatud Trp-d ei mõjuta olulisel määral tiofeeni sisaldava adenosini jäljendava fragmendi neeldumissomadusi ja säilib ka Trp-le omane neeldumine.

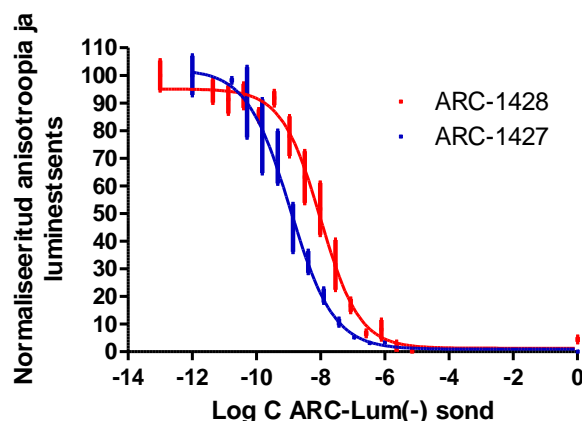


**Joonis 17.** Trüptofaani ja ARC-Lum(-) sondide ARC-668, ARC-1427 ning ARC-1428 neeldumisspektrid fosfaatpuhvril pH=7,4.

### 5.3. ARC-Lum(-) sondi seondumine PKAc-le

Kuna trüptofaani lisamine sondi struktuuri võib tuua kaasa sondide sidumisomaduste muutumise võrreldes ARC-668-ga ( $K_d=0,02$  nM), siis määrati Trp-ga ARC-Lum(-) sondide ARC-1427 ja ARC-1428 ning PKAc vaheline afiinsus (kompleksi  $K_d$ ) eespool kirjeldatud väljatõrjumismeetodil. Aegviivitatud luminesentsi mõõtmisandmeid kasutades saadi ARC-1427  $K_d$  väärtuseks  $0,02\pm0,01$  nM,  $k=2$  ( $k$  on kattetegur usaldusnivool 95%). Kasutades fluorestsentsi anisotroopia kõverat (joonis 18), saadi ARC-1428  $K_d$  väärtuseks  $0,26\pm0,14$  nM,  $k=2$  (kattetegur usaldusnivool 95%). Sellest saame järeldada, et mõlemad sondid seonduvad hästi PKAc-le, kuigi kolme Trp liitmine on sondi afiinsust PKAc suhtes halvendanud. Ühekordse mõõtmise järgi ühe Trp lisamine  $K_d$ -d oluliselt ei muuda. Kuna mõlema mõõtmise määramatus on suur, siis tuleks  $K_d$ -de täpsete väärtuste teadasaamiseks katseid korrata. Antud töö jaoks ei olnud  $K_d$ -de täpsem määramine oluline.

Leitud  $K_d$ -de väärtuste põhjal sai fluorestsentsspektrite analüüsil teha üle lihtsustuse. Nimelt kasutati fluorestsentspektrite mõõtmisel lahuseid, kus sondi ja PKAc kontsentratsioon oli ligikaudu 1  $\mu$ M. Sellise ainete kontsentratsiooni juures on kompleksi seotud 98,40 % ARC-1428-st ja 99,55 % ARC-1427-st ehk peaaegu kõik sondi molekulid on komplekseerunud ja seetõttu tehti fluorestsentsspektrite arvutuste juures lihtsuse mõttes lähendus, et 1  $\mu$ M aktiivne PKAc suudab ära siduda 1  $\mu$ M ARC-Lum(-) sondi.



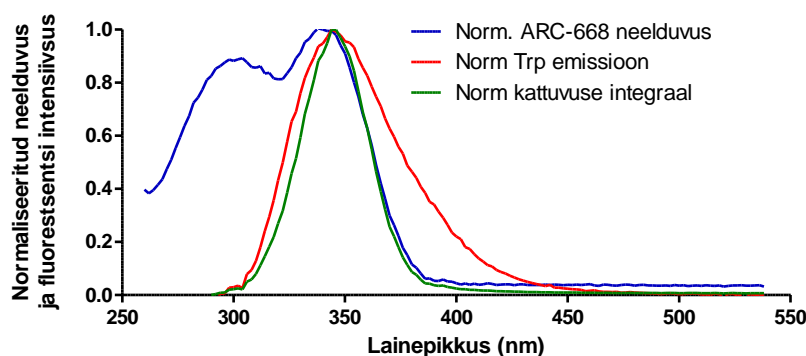
**Joonis 18.** ARC-Lum(-) sondide ARC-1427 ja ARC-1428 normaliseeritud väljatõrjumisekõverad. Vearibad näitavad kolme kõvera standardhälvet.

#### 5.4. Trüptofaani ja ARC-Lum(-) sondi vaheline FRET

Kõik trüptofaani ja ARC-Lum(-) sondi ARC-668 vahelised FRETi puudutavad arvutused viidi läbi vastavalt peatükis 3.5 esitatud kirjeldusele. Antud FRETi paari vahelised arvutatud  $R_0$  väärtused on esitatud vastavalt  $\kappa^2$ -le tabelis 1, ning FRETi paari normaliseeritud spektrid joonisel 20.

**Tabel 1.** Trüptofaani ja ARC-668 vahelised Försteri distantsid.

$\kappa^2$	0,667	1,000	4,000
$R_0$ (nm)	2,3	2,5	3,1
$J$ ( $M^{-1} cm^{-1} nm^4$ )	$6,57 \cdot 10^{13}$	$6,57 \cdot 10^{13}$	$6,57 \cdot 10^{13}$

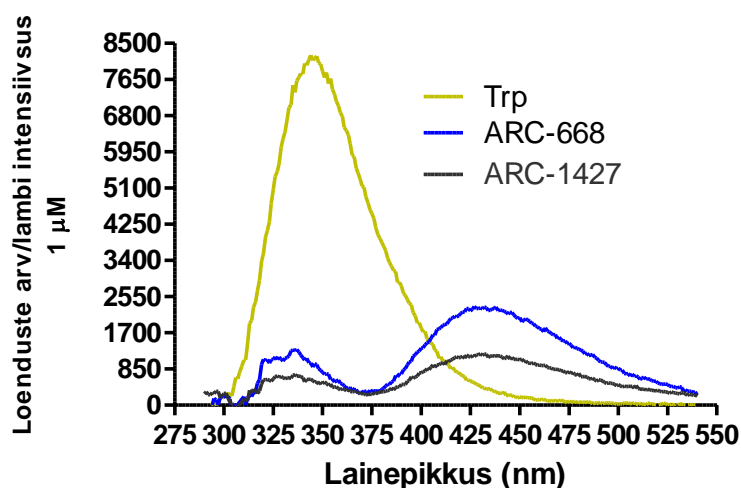


**Joonis 20.** Normaliseeritud Trp neeldumisspekter ja ARC-668 neeldumisspekter ning nende vaheline kattuvuseintegraal.

ARC-1427 struktuuris oleva trüptofaani ja adenosini vahelised mõõdetud kaugused jäid vahemikku 1,4 – 2,4 nm, mis on FRETi efektiivseks toimumiseks täiesti piisav. Märkida tasuks, et konformeerii struktuuris, mille korral vahemikke mõõdeti, asetusi Trp ja adenosini

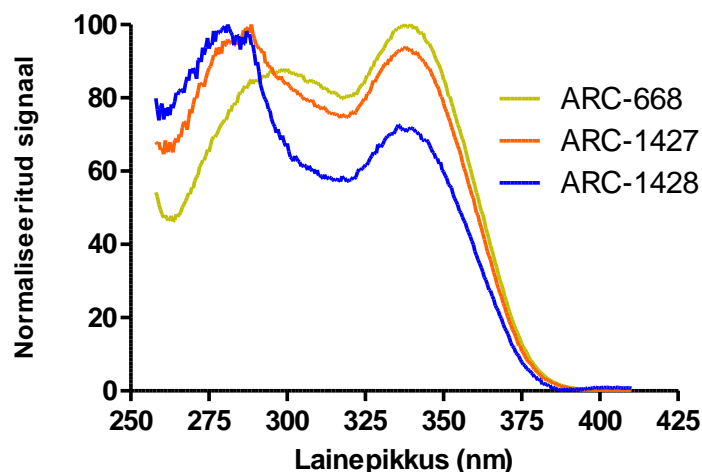
jäljendav fragment üksteisest peaaegu maksimaalsel kaugusel (lisa 1) ja seega võivad lahuses oleva molekuli korral fragmendid olla üksteisele oluliselt lähemal. Minimaalse ja maksimaalse mõõdetud kauguse jaoks saadi FRETi teoreetilised efektiivsused: 95,5 % ja 45,4 %, mis näitab seda, et intramolekulaarselt võib trüptofaanilt toimuda väga efektiivselt energiaülekanne ARC-Lum(-) sondi adenosini jäljendavale fragmendile.

Vaadeldes emissioonispektrit ergastava lainepikkusega 280 nm, peaks FRETi toimumise korral sondi spektris vähenema Trp-le vastav emissioon. Tõepoolest, võrreldes vaba trüptofaaniga on ARC-1427 spektris trüptofaanile vastav emissioon oluliselt vähenenud (joonis 21). Fluorestsentsi intensiivsuse muutuse põhjal arvutati FRETi efektiivsus (võrrand 10), milleks saadi ligikaudu 90 % ja selle vastav vahekaugus 1,6 nm, mis jääb teoreetilisse vahemikku. Samas ei ole aktseptori fluorestsentsi intensiivsus suurenenud, mistõttu ei saa päris kindlalt väita, et on toimunud FRET. Fluorestsentsi intensiivsuse vähenemise põhjuseks võib olla ka fluorestsentsi kustutamine.

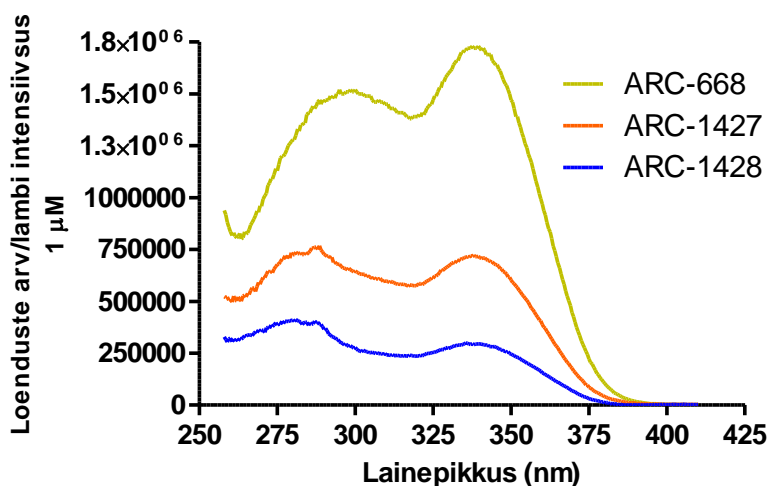


**Joonis 21.** Trüptofaani, ARC-668 ja ARC-1427 emissioonispektrid. Ergastuse lainepikkus oli 280 nm.

Kui uurida ARC-Lum(-) sondide ergastusspektreid, mille korral on emissiooni mõõdetud 440 nm juures (adenosini analoogile vastav emissioon, Trp-le vastav emissioon on kaduvväike), siis selgub, et Trp liitmine sondi struktuuri on selle ergastusspektrit muutnud, sest 280 nm juures on suurenenud Trp-le vastav ergastumise osakaal võrreldes adenosini analoogi ergastumisega 340 nm juures (joonis 22) ja sellest saab järeldada, et on toimunud energia ülekanne Trp-lt sondile. Samas on Trp jäagi lisamine vähendanud ARC-Lum(-) sondi ergastumist ehk on toimunud kustutamine, mis tähendab, et kuigi tõenäoliselt on toimunud energiaülekanne Trp-lt adenosini analoogile, siis kustutamise efekt on sellest isegi suurem.



**Joonis 22.** ARC-Lum(-) sondide normaliseeritud ergastusspektrid. Emissiooni mõõdeti lainepikkusel 440 nm.



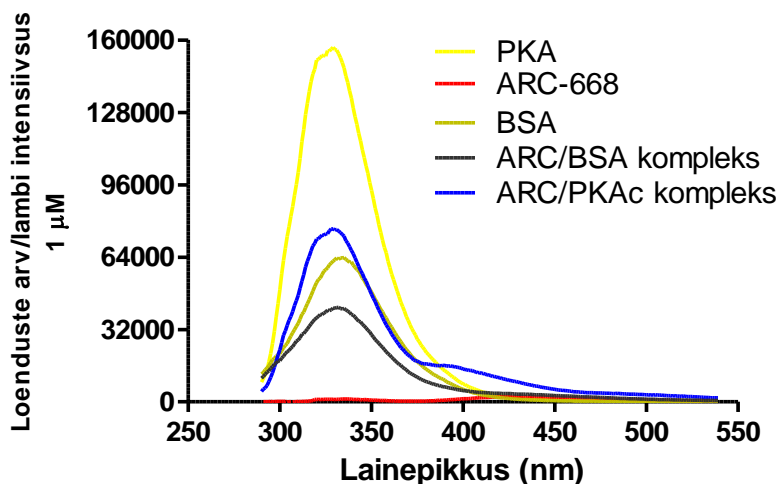
**Joonis 23.** ARC-Lum(-) sondide ergastusspektrid. Emissiooni mõõdeti lainepikkusel 440 nm.

## 5.5. ARC-Lum(-) sondide ja valgu vaheline FRET

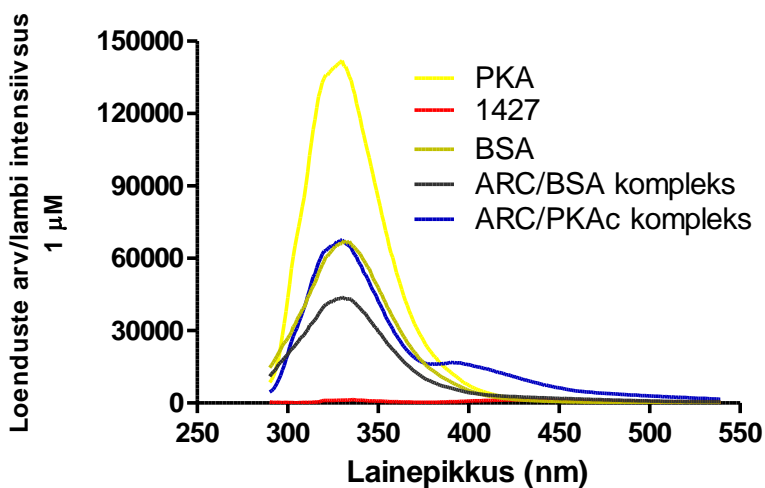
Sondide fluorestsentsi spektrid mõõdeti vastavalt peatükis 3.4 esitatud kirjeldusele. Mõõtmised teostati kolme erineva ARC-Lum(-) sondiga (ARC-668, ARC-1427 ja ARC-1428) nii ilma valkudeta, kui ka PKAc ja BSA juuresolekul. Lisaks mõõdeti ka eraldi PKAc ja BSA spektrid.

Ergastades proove 280 nm juures, ergastuvad Trp ja mõningal määral ka sondi struktuuri kuuluv adenosiini jäljendav fragment. Kuna valgu koostisse kuulub rohkem Trp-sid, kui sondi struktuuri (BSA ja PKAc struktuuris on vastavalt 2 ja 6 trüptofaani jääki), siis on emissioonispektris ARC-Lum(-) sondile omane fluorestsents varjutatud valgu Trp-de emissiooni poolt ja vastav emissioonispekter iseloomustab eelkõige valgu Trp-de

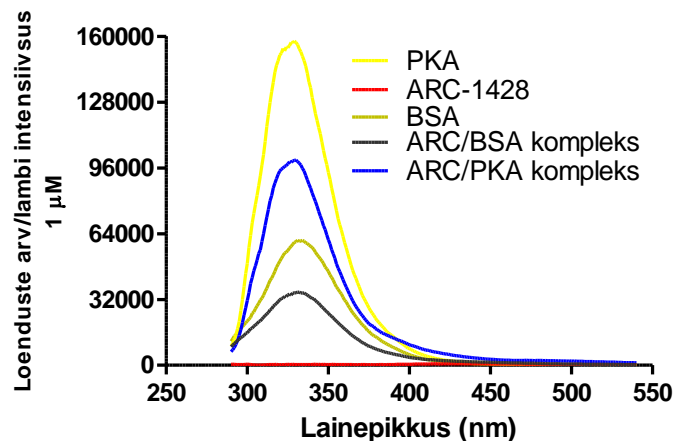
fluorestsentsi. Kui võrrelda vaba PKAc emissioonispektrit ARC-Lum(-) sondi ja PKAc vahelise kompleksi emissioonispektriga, siis on joonistelt näha (joonised 24-26), et kõigi kolme sondi korral on toimunud valgu fluorestsentsi intensiivsuse vähenemine, mis tähendab, et tõenäoliselt on osa Trp poolt neelatud energiast üle kandunud ARC-Lum(-) sondi adenosiini jäljendavale osale. Neilt spektritelt saadi teada, kui palju vähenes valgu enda fluorestsentsi intensiivsus sondi juuresolekul ja seda teadmist kasutati ka teiste spektrite analüüsil.



**Joonis 24.** ARC-Lum(-) sondi ARC-668, PKAc, BSA ja nende segude fluorestsentsi emissioonispektrid (ergastuse lainepikkus 280 nm).



**Joonis 25.** ARC-Lum(-) sondi ARC-1427, PKAc, BSA ja nende segude fluorestsentsi emissioonispektrid (ergastuse lainepikkus 280 nm).



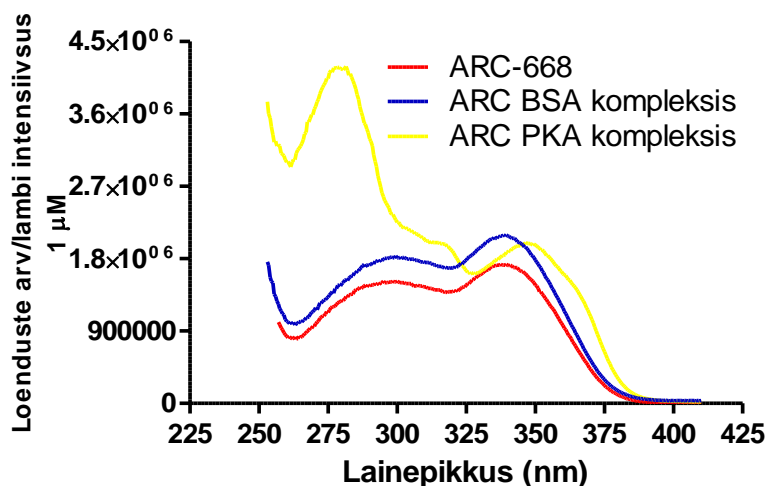
**Joonis 26.** ARC-Lum(-) sondi ARC-1428, PKAc, BSA ja nende segude fluorestsentsi emissioonispektrid (ergastuse lainepikkus 280 nm).

FRETi toimumist on võimalik hinnata ka ergastusspektrite järgi (joonised 27-29). Kui emissiooni on mõõdetud 440 nm juures ehk ARC-Lum(-) sondile kui doonorile iseloomulikus emissiooni lainepikkuste vahemikus (trüptofaani emissioon on sellel lainepikkusel väga väike), siis on tulemustest näha, et kompleksis PKAc-ga on kõikide sondide ergastusspektri kuju muutunud: võrreldes vaba ARC-Lum(-) sondiga, on PKAc-ga kompleksis oleva sondi ergastuse osatähtsus 280 nm juures oluliselt suurenenud. Seejuures on ergastuse osatähtsus 280 nm juures oluliselt suurenenud ka PKAc-ga kompleksis oleva ARC-668 korral. Selle sondi puhul ei ole võimalik, et 280 nm juures suurenenud ergastumine on tulnud millestki muust kui valgu Trp-delt (teiste sondide korral võib see tulla ka sondi struktuuri kuuluva(te)lt Trp-lt) ja sellest saab järeldada, et valgu Trp-lt on toimunud FRET sondi adenonsiini jäljendavale osale.

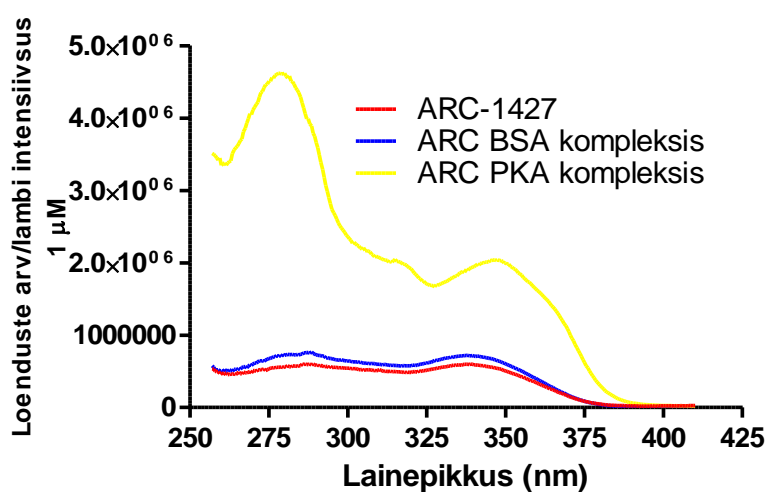
BSA lisamisel sondi ergastusspektri kuju ei muutu, kuid BSA fluorestsentsi intensiivsus väheneb ja sondi fluorestsentsi intensiivsus suureneb. Oluliselt suureneb sondi ARC-1428 intensiivsus. Sellest võib järeldada, et BSA poolt neelatud energia kandub küll sondile üle, kuid hajub ilmselt soojusena. Täpset kustutamise mehhanismi ei saa olemasolevate andmete põhjal välja pakkuda. Sondi fluorestsentsi intensiivsuse suurenemist võib põhjendada pinnaefektidega: osa sondist võib olla seotud küveti pinnale ja BSA lisamisel võib see sealt vabaneda seetõttu, et BSA seondub ise küveti pinnale. Samas võib toimuda ka BSA ja sondi omavaheline nõrk seostumine, mis stabiliseerib sondi, vähendades intramolekulaarseid liikumisi ja ühtlasi suurendades kvantsaagist. Kuna sondi ARC-1428 puhul oli intensiivsuse tõus BSA lisamisel märgatav, aga sondi ARC-1427 puhul mitte, siis võib sellest järeldada, et kolme Trp lisamisel sondi struktuuri suureneb sondi hüdrofoobsus oluliselt ja seetõttu suurenevad ka mittespetsiifilised interaktsioonid, kuid ühe Trp lisamine



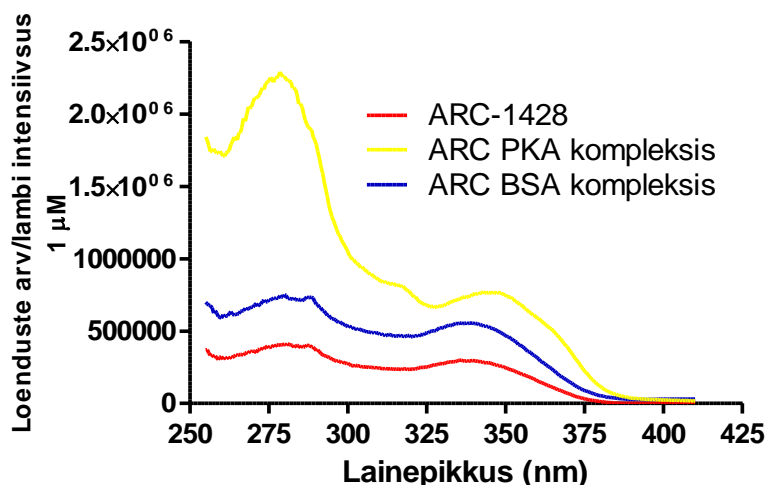
sondi hüdrofoobsust olulisel määral ei mõjuta. Kokkuvõtlikult võib saadud tulemustest järeldada, et toimub energia ülekanne nii BSA kui ka PKAc struktuuri kuuluvatelt Trp jääkidelt ARC-Lum(-) sondidele, kusjuures kompleksis PKAc-ga selle energiaülekande tulemusel sondi fluorestsentsi intensiivsus suureneb.



**Joonised 28.** ARC-Lum(-) sondi ARC-668, PKAc, BSA ja nende segude fluorestsentsi ergastusspektrid. Emissiooni lainepikkus oli 440 nm.



**Joonised 29.** ARC-Lum(-) sondi ARC-1427, PKAc, BSA ja nende segude fluorestsentsi ergastusspektrid. Emissiooni lainepikkus oli 440 nm.



**Joonis 30.** ARC-Lum(-) sondi ARC-1428, PKAc, BSA ja nende segude fluorestsentsi ergastusspektrid. Emissiooni lainepikkus oli 440 nm.

Joonistelt 28-30 nähtub, et seondumisel PKAc-ga nihkub tiofeeni sisaldava fragmendi ergastusspekter pikemate lainepikkuste poole. Sarnast nähtust on varem täheldatud ka ARC-668 puhul pH=2 juures [61], mistõttu võib arvata, et nihkumise põhjuseks on vesiniksideme moodustumine sondi struktuuri kuuluva adenosiini analoogi vaba elektronpaariga lämmastiku aatomi ja valgust pärineva vesiniksideme doonori vahel.

Kui ergastada sondi lainepikkusel 340 nm, siis ergastub peaaesjalikult ainult sondi adenosiini jäljendav osa ja sellest tulenevalt ongi emissioonispektris vaadeldav ainult sondi adenosiini jäljendava fragmendi fluorestsentsi emissioon (lisad 2-4). Sellise mõõtmisviisiga emissioonispektris saab hinnata, kuidas ja kui palju muutub tiofeeni sisaldava fragmendi emissioon, kui ta interakteerub valguga. Kuna valguga interakteerumisel sondi emissioonispekter nihkub, siis ei saa fluorestsentsi intensiivsuse maksimumi järgi suurenemise määra arvutada, vaid võrdluseks tuleb kasutada spektrite joonealust pindala. Kõikide sondide puhul nende fluorestsentsi intensiivsus kasvas PKAc või BSA lisamisel (lisad 2-4). Kuna nendel tingimustel pole FRETi toimumine Trp-Ilt võimalik, siis võib arvata, et valguga seondumine kaitseb sondi selle ergastatud oleku deaktiveerimise eest, näiteks vee molekulide või puhvris lahustunud hapniku poolt. Sondide intensiivsuse kasv kompleksis võrreldes vaba sondiga on esitatud tabelis 2.

Lisadelt 2-4 nähtub ka, et trüptofaanide lisamisel sondi struktuuri fluorestsentsi intensiivsus vähenes, aga kindlat kustutamise mehhanismi selle tulemuse alusel välja pakkuda ei saa.

**Tabel 2.** ARC-Lum(-) sondide fluorestsentsi intensiivsuse kasv interaktsioonil valguga.

ARC-Lum(-) sond	Fluorestsentsi võimendus PKAcga (kordades)	Fluorestsentsi võimendus BSAGA (kordades)
ARC-668	1.73	1.25
ARC-1427	3.95	1.02
ARC-1428	2.25	1.7

## 6. Kokkuvõte

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida UV-Vis- ja fluorestsents-spekroskoopia abil trüptofaani (Trp) ja ARC-Lum(-) sondide struktuuri kuuluva adensiini analoogi vahelisi energiaülekandeid. Uurimistöös kasutati ARC-Lum(-) sondi ARC-668 baasil välja arendatud sonde ARC-1427 ja ARC-1428, milles linker struktuurile oli kovalentselt seotud vastavalt üks või kolm Trp-d. Lisaks teostati mõõtmised, mille järgi hinnati valgu koostisesse kuuluvate Trp-de ja ARC-Lum(-) sondide struktuuri kuuluva adensiini analoogi vahel toimuvaid energiaülekandeid. Valkudena kasutati cAMP sõltuva proteiinkinaasi katalüütilist subühikut (PKAc-d) ja mittespetsiifilise seondumise iseloomustamiseks veiseseerumi albumiini (BSA-d).

ARC-Lum(-) sondid on bisubstraatsed inhibiitorid, mis seonduvad AGC-rühma kuuluvatele proteiinkinaasidele ning mille struktuuri kuuluv adensiini analoog sisaldab fragmenti tiofeenist või selenofeenist. Antud töös kasutati mudelkinaasina PKAc-d. Sondide seondumisomaduste iseloomustamiseks kasutati varem välja töötatud väljatõrjumismeetodit. Mitme Trp lisamine ARC-Lum(-) sondi struktuuri vähendas sondi afiinsust PKA suhtes, kuid sellegipoolest seonduvad Trp-sid sisaldavad ARC-Lum(-) sondid ARC-1427 ja ARC-1428 PKA-le väga hästi.

Sondide neeldumisspektritest nähtus, et adensiini jälgendava fragmenti neeldumisspekter pole olulisel määral mõjutatud linker asendisse lisatud Trp-dest: Trp ja tiofeeni sisaldav adensiini analoog käituvad ka intramolekulaarselt kui kaks sõltumatut kromofoori.

Trp emissioonispektri ja ARC-668 neeldumisspektri kattuvusintegraali alusel hinnati nende fluorofooride vahelise Försteri resonantsenergia ülekande (FRETi) võimalikkust. Samas hinnati sobiva tarkvara abil ka nende fluorofooride omavahelise kaugusi ARC-1427 molekulis. Saadud tulemuste põhjal leiti, et intramolekulaarselt saab toimuda väga efektiivne FRET. Mõõdetud sondide ja sondi ning valkude kompleksi fluorestsentsispektrite analüüsil selgus, et FRET toimubki kirjeldatud fluorofooride paari vahel nii intra- kui ka intermolekulaarselt. Lisaks selgus fluorestsentsispektrite analüüsil, et Trp võib olla ARC-Lum(-) sondi fluorestsentsi kustutajaks. Kustutamise mehhanismi määramiseks tuleks teostada täiendavaid katseid.

BSA-ga teostatud katsete põhjal võib arvata, et kolme Trp lisamine sondi struktuuri mõjutab oluliselt sondi hüdrofoobsust ja suurendab mittespetsiifilist seondumist. Seetõttu leiti kahest uuritud uuest sondist edasise arendustöö jaoks sobivam olevat ARC-1427.

# **Energy Transfer Between Tryptophan and ARC-Lum(-) Probe**

Maikel Pulk

## **Summary**

The aim of this Bachelor's thesis was to study the energy transfer between tryptophan (Trp) and ARC-Lum(-) probes by UV-Vis and fluorescence spectroscopy. The ARC-Lum(-) probes applied in this work were ARC-1427 and ARC-1428. These probes were designed based on the structure of ARC-Lum(-) probe ARC-668. One or three Trp residues were covalently introduced into the linker structure of ARC-668. These probes were applied to study the intramolecular energy transfer between Trp residues and the thiophene-containing moiety of the ARC-Lum(-) probe. Intermolecular energy transfer was also studied. For this, the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase (PKAc) and bovine serum albumin (BSA) were added to ARC-Lum(-) probes and the fluorescence spectra were recorded.

ARC-Lum(-) probes are bisubstrate inhibitors of AGC-type protein kinases that incorporate a photoluminescent thiophene- or selenophene-containing moiety in its structure. In the current work, PKAc was applied as a model kinase. The binding of the probes was studied using a displacement assay. The addition of several Trp residues decreased the affinity of the probes, however, both Trp-containing probes still bound to PKAc with very high affinity.

The absorption spectrum of the thiophene-containing adenosine analogue moiety was not affected by the Trp residues added to the linker. Also, the absorption of Trp could be clearly distinguished in the absorption spectrum of the probes.

The theoretical parameters of FRET between Trp and thiophene-containing moiety were calculated based on the overlap integral of Trp emission spectrum and the absorption spectrum of ARC-668. In addition, the distance between the fluorophores in the structure of ARC-1427 was measured using the appropriate software. According to the results there can be very efficient intramolecular FRET between the fluorophores. From the fluorescence spectra measured it was concluded that both intramolecular and intermolecular FRET occur. It was established that the presence of Trp residues both intra- and intermolecularly decreases the fluorescence intensity of ARC-Lum probes.

Based on the results of experiments with BSA it was concluded that incorporation of three Trp residues into the probes increased hydrophobicity of probes and lead to more intensive non-specific binding to a non-kinase protein.

## 7. Viited

- [1] J. Verhoeven, "GLOSSARY OF TERMS USED IN PHOTOCHEMISTRY (IUPAC Recommendations 1996)," *Pure Appl. Chem*, vol. 68, no. 12, p. 2258, 1996.
- [2] J. Verhoeven, "GLOSSARY OF TERMS USED IN PHOTOCHEMISTRY (IUPAC Recommendations 1996)," *Pure Appl. Chem*, vol. 68, no. 12, p. 2250, 1996.
- [3] J. R. Lakowicz, "Jablonski diagram," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006, p. 5.
- [4] A. D. McNaught and A. Wilkinson, "IUPAC Gold Book - Kasha rule," *Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006)*, 1997. Kättesaadav veebist: <http://goldbook.iupac.org/K03370.html>. [Viimati alla laetud: 29.03.2014].
- [5] J. W. VERHOEVEN, "GLOSSARY OF TERMS USED IN PHOTOCHEMISTRY (IUPAC Recommendations 1996)," *Pure Appl. Chem*, vol. 68, no. 12, pp. 2223–2286, 1996.
- [6] J. R. Lakowicz, "Introduction to Fluorescence," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006, p. 9.
- [7] R. Kolinski and R. F. Steiner, "The Phosphorescence of Oligopeptides Containing Tryptophan and Tyrosine", *Biochemistry*, 1967.
- [8] J. R. Lakowicz, "Fluorescence anisotropy," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Erd., Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006, pp. 12 – 13.
- [9] K. Kakehi, Y. Oda, and M. Kinoshita, "Fluorescence polarization: analysis of carbohydrate-protein interaction.," *Anal. Biochem.*, vol. 297, no. 2, pp. 111–6, Oct. 2001.
- [10] J. R. Lakowicz, "Energy transfer," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006, pp. 443 – 472.
- [11] J. R. Lakowicz, "Introduction to Fluorescence," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006, p. 13.
- [12] S. Alberti, D. R. Parks, and L. a Herzenberg, "A single laser method for subtraction of cell autofluorescence in flow cytometry.," *Cytometry*, vol. 8, no. 2, pp. 114–9, Mar. 1987.
- [13] R. E. Connally and J. a Piper, "Time-gated luminescence microscopy.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1130, pp. 106–116, Jan. 2008.
- [14] L. Murphy, A. Congreve, L.-O. Pålsson, and J. a G. Williams, "The time domain in co-stained cell imaging: time-resolved emission imaging microscopy using a protonatable luminescent iridium complex.," *Chem. Commun.*, vol. 46, no. 46, pp. 8743–8745, Dec. 2010.
- [15] E. Enkvist, A. Vaasa, M. Kasari, M. Kriisa, T. Ivan, K. Ligi, G. Raidaru, and A. Uri, "Protein-Induced Long Lifetime Luminescence of Nonmetal Probes," pp. 1052–1062, 2011.
- [16] 1998-2014 PerkinElmer Inc., "Time-resolved fluorescence assays (TRF, TR-FRET)," 2014. Kättesaadav veebist: [http://www.perkinelmer.com/resources/technicalresources/applicationsupportknowledgebase/microplates/fluorescence\\_plates.xhtml](http://www.perkinelmer.com/resources/technicalresources/applicationsupportknowledgebase/microplates/fluorescence_plates.xhtml). [Viimati alla laetud: 12.04.2014].
- [17] A. V Naumov, S. M. Bachilo, D. A. Tsybolski, and R. B. Weisman, "Electric Field Quenching of Carbon Nanotube Photoluminescence 2008," *Nano Lett.*, vol. 8, no. 5, pp. 1527–1531, 2008.
- [18] R. Ciasson, E. J. Lee, X. Zbao, and M. S. Wrighton, "Inter- and Intramolecular Quenching of the Singlet Excited State of Porphyrins by Ferrocene," *J. Phys. Chem.*, vol. 97, no. 11, pp. 2596–2601, 1993.
- [19] S. Hassoon, H. Lustig, M. B. Rubin, and S. Speiser, "The Mechanism of Short-Range Intramolecular Electronic Energy Transfer in Bichromophoric Molecules," *J. Phys. Chem.*, vol. 3, no. 6, pp. 6367–6374, 1984.

- [20] S. Doose, H. Neuweiler, and M. Sauer, "Fluorescence quenching by photoinduced electron transfer: a reporter for conformational dynamics of macromolecules.," *Chemphyschem*, vol. 10, no. 9–10, pp. 1389–98, Jul. 2009.
- [21] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, and C. a Seidel, "Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis.," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 13, pp. 2651–9, Jul. 1998.
- [22] H. Fang, F. Mighri, and A. Ajji, "Fluorescence Quenching of Phenanthrene and Anthracene by Maleic Anhydride and n -Octadecenylsuccinic Anhydride in Solution and in Bulk Polypropylene," *Polym. Eng. Sci.*, 2007.
- [23] G. I. S. and N. M. B. V. I. Makarov, N. L. Lavrik, "MAGNETIC FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE QUENCHING OF GAS-PHASE SULFUR DIOXIDE," *React. Kinet. Catal. Lett*, vol. 12, no. 3, pp. 225–227, 1979.
- [24] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third. Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006.
- [25] J. R. Lakowicz, "Theory of Collisional Quenching," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006, pp. 278 – 289.
- [26] M. Seery, "Quenching Mechanisms | The Photochemistry Portal on WordPress.com," 2009. [Kättesaadav veebist: <http://photochemistry.wordpress.com/2009/10/30/quenching-mechanisms/>. [Viimati alla laetud: 14.03.2014].
- [27] J. R. Lakowicz, "Comparison of Quenching and Resonance Energy Transfer," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006, pp. 331 – 335.
- [28] University of California, "Dexter Energy Transfer - Chemwiki," *UC Davis GeoWiki*, 2013. Kättesaadav veebist: [http://chemwiki.ucdavis.edu/Theoretical\\_Chemistry/Fundamentals/Dexter\\_Energy\\_Transfer](http://chemwiki.ucdavis.edu/Theoretical_Chemistry/Fundamentals/Dexter_Energy_Transfer). [Viimati alla laetud: 14.03.2014].
- [29] J. R. Lakowicz, "Mechanisms of Quenching," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006, p. 335.
- [30] J. R. Lakowicz, "Mechanism and Dynamics of Fluorescence Quenching," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006, pp. 335 – 341.
- [31] N. W. Lucchi, J. Narayanan, M. a Karell, M. Xayavong, S. Kariuki, A. J. DaSilva, V. Hill, and V. Udhayakumar, "Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR.," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e56677, Jan. 2013.
- [32] A. Yamane, "MagiProbe: a novel fluorescence quenching-based oligonucleotide probe carrying a fluorophore and an intercalator.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 19, pp. 297–8, Jan. 2002.
- [33] S. Tyagi and F. R. Kramer, "Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization," *Nat. Biotechnol.*, vol. 14, 1995.
- [34] D. L. Nelson and M. M. Cox, "Lehninger Principles of Biochemistry," *Lehninger Princ. Biochem.*, 2008.
- [35] S. Prahl, "Tryptophan," 2012. Kättesaadav veebist: <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/091.html>. [Viimati alla laetud: 26.05.2014].
- [36] D. Creed, "THE PHOTOPHYSICS AND PHOTOCHEMISTRY OF THE AND ITS SIMPLE DERIVATIVES NEAR-UV ABSORBING AMINO ACIDS. I. TRYPTOPHAN," *Photochem. und Phorobiology*, vol. 39, no. 4, pp. 531 – 562, 1984.
- [37] F. Beierlein and O. Othersen, "Simulating FRET from tryptophan: is the rotamer model correct?," *J. ...*, pp. 5142–5152, 2006.
- [38] J. Albani, "Fluorescence lifetimes of tryptophan: structural origin and relation with So→ 1Lb and So→ 1La transitions," *J. Fluoresc.*, pp. 1061–1071, 2009.
- [39] J. R. Alcalá, E. Gratton, and F. G. Prendergast, "Fluorescence lifetime distributions in proteins.," *Biophys. J.*, vol. 51, no. 4, pp. 597–604, Apr. 1987.

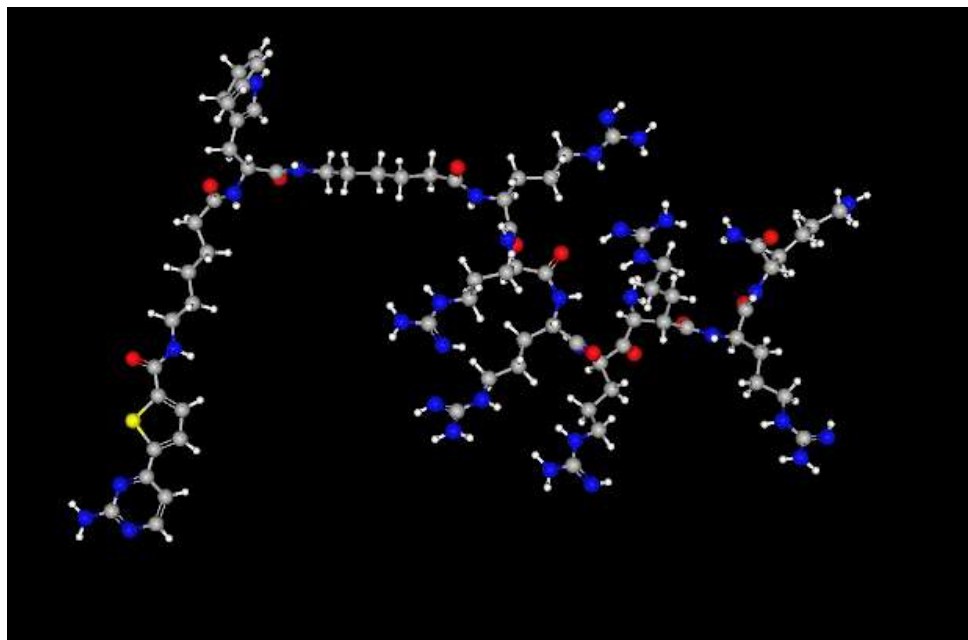
- [40] J. Albani, "Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 2: Fluorescence lifetimes origin of tryptophan in proteins," *J. Fluoresc.*, 2013.
- [41] M. Gonnelli and G. Strambini, "Phosphorescence lifetime of tryptophan in proteins," *Biochemistry*, pp. 13847–13857, 1995.
- [42] P. Cioni and G. B. Strambini, "Tryptophan phosphorescence and pressure effects on protein structure," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1595, pp. 116–130, 2002.
- [43] J. E. Bailey, G. H. Beaven, D. A. Chignell, and W. B. Gratzer, "An Analysis of Perturbations in the Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Model Compounds," *Eur. J. Biochem.*, vol. 7, pp. 5–14, 1968.
- [44] M. Hospes, J. Hendriks, and K. J. Hellingwerf, "Tryptophan fluorescence as a reporter for structural changes in photoactive yellow protein elicited by photo-activation," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 12, no. 3, pp. 479–88, Mar. 2013.
- [45] Y. Xie, T. Maxson, and Y. Tor, "Fluorescent ribonucleoside as a FRET acceptor for tryptophan in native proteins," *J. Am. Chem. ...*, no. Scheme 1, pp. 11896–11897, 2010.
- [46] J. R. Albani, "Förster energy-transfer studies between Trp residues of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (orosomucoid) and the glycosylation site of the protein," *Carbohydr. Res.*, vol. 338, no. 21, pp. 2233–2236, Oct. 2003.
- [47] N. Marmé and J. Knemeyer, "Inter-and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan," *Bioconjugate ...*, vol. 14, pp. 1133–1139, 2003.
- [48] S. K. Hanks, a M. Quinn, and T. Hunter, "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains," *Science*, vol. 241, no. 4861, pp. 42–52, Jul. 1988.
- [49] P. a Schwartz and B. W. Murray, "Protein kinase biochemistry and drug discovery," *Bioorg. Chem.*, vol. 39, no. 5–6, pp. 192–210, Dec. 2011.
- [50] J. Pláteník, Z. Fišar, R. Buchal, R. Jiráček, E. Kitzlerová, M. Zvěřová, and J. Raboch, "GSK3 $\beta$ , CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and depression," *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 50, pp. 83–93, Apr. 2014.
- [51] M. Narlik-grassow, C. Blanco-aporicio, and A. Carnero, "The PIM Family of Serine / Threonine Kinases in Cancer," no. 0, pp. 1–24.
- [52] B. B. Kahn, T. Alquier, D. Carling, and D. G. Hardie, "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism," *Cell Metab.*, vol. 1, no. 1, pp. 15–25, Jan. 2005.
- [53] H. R. Stephen P. DAVIES, "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors," *Biochem. J.*, vol. 351, pp. 95–105, 2006.
- [54] E. Enkvist, D. Lavogina, G. Raidaru, A. Vaasa, I. Viil, M. Lust, K. Viht, and A. Uri, "Conjugation of Adenosine and Hexa- ( D -arginine ) Leads to a Nanomolar Bisubstrate-Analog Inhibitor of Basophilic Protein Kinases," pp. 7150–7159, 2006.
- [55] D. Lavogina, E. Enkvist, and A. Uri, "Bisubstrate Inhibitors of Protein Kinases: from Principle to Practical Applications," *ChemMedChem*, vol. 5, pp. 23–34, 2010.
- [56] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam, "The protein kinase complement of the human genome," *Science*, vol. 298, no. 5600, pp. 1912–34, Dec. 2002.
- [57] D. Lavogina, M. Lust, I. Viil, N. König, G. Raidaru, J. Rogozina, E. Enkvist, A. Uri, and D. Bossemeyer, "Structural analysis of ARC-type inhibitor (ARC-1034) binding to protein kinase A catalytic subunit and rational design of bisubstrate analogue inhibitors of basophilic," *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 2, pp. 308–321, 2009.
- [58] A. Vaasa, I. Viil, E. Enkvist, K. Viht, G. Raidaru, D. Lavogina, and A. Uri, "High-affinity bisubstrate probe for fluorescence anisotropy binding/displacement assays with protein kinases PKA and ROCK," *Anal. Biochem.*, vol. 385, no. 1, pp. 85–93, Feb. 2009.
- [59] M. Kasari, K. Ligi, J. A. G. Williams, A. Vaasa, E. Enkvist, K. Viht, L. Pålsson, and A. Uri, "Biochimica et Biophysica Acta Responsive microsecond-lifetime photoluminescent probes for analysis of protein kinases and their inhibitors," *BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1834, no. 7, pp. 1330–1335, 2013.
- [60] A. Pflug, J. Rogozina, D. Lavogina, E. Enkvist, A. Uri, R. A. Engh, and D. Bossemeyer, "Diversity of bisubstrate binding modes of adenosine analogue-oligoarginine conjugates in



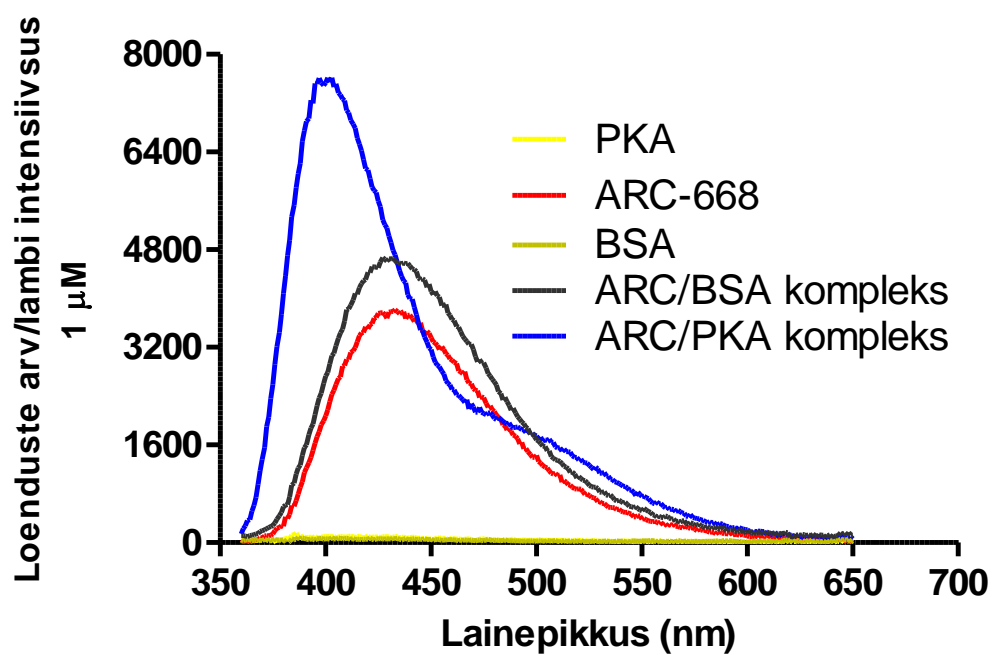
- protein kinase a and implications for protein substrate interactions.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 403, no. 1, pp. 66–77, Oct. 2010.
- [61] E. Enkvist, A. Vaasa, M. Kasari, M. Kriisa, T. Ivan, K. Ligi, and A. Uri, “Protein-induced long lifetime luminescence of non-metal probes Supplementary information.”
  - [62] M. A. Hink, N. V Visser, J. W. Borst, A. Van Hoek, and A. J. W. G. Visser, “Practical Use of Corrected Fluorescence Excitation and Emission Spectra of Fluorescent Proteins in Förster Resonance Energy Transfer ( FRET ) Studies,” vol. 13, no. 2, pp. 1–4, 2003.
  - [63] A. J. W. G. Visser, E. S. Vysotski, and J. Lee, “Critical Transfer Distance Determination Between FRET Pairs,” *PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES ONLINE*, 2011. Kättesaadav veebist: <http://www.photobiology.info/Experiments/Biolum-Expt.html>. [Viimati alla laetud: 24.05.2014].
  - [64] J. R. Lakowicz, “Theory of energy transfer for a donor-acceptor pair,” in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2006, pp. 445–449.
  - [65] E. M. S. Stennett, M. a Ciuba, and M. Levitus, “Photophysical processes in single molecule organic fluorescent probes.,” *Chem. Soc. Rev.*, Oct. 2013.
  - [66] R. L. Schoch, L. E. Kapinos, and R. Y. H. Lim, “Nuclear transport receptor binding avidity triggers a self-healing collapse transition in FG-nucleoporin molecular brushes. Supporting Information,” *PNAS*, vol. 109, no. 42, pp. 1–8, 2012.
  - [67] X. Fang and R. Wang, “The Ki Calculator,” 2004. Kättesaadav veebist: [http://sw16.im.med.umich.edu/software/calc\\_ki/](http://sw16.im.med.umich.edu/software/calc_ki/). [Viimati alla laetud: 16.05.2014].

## Lisad

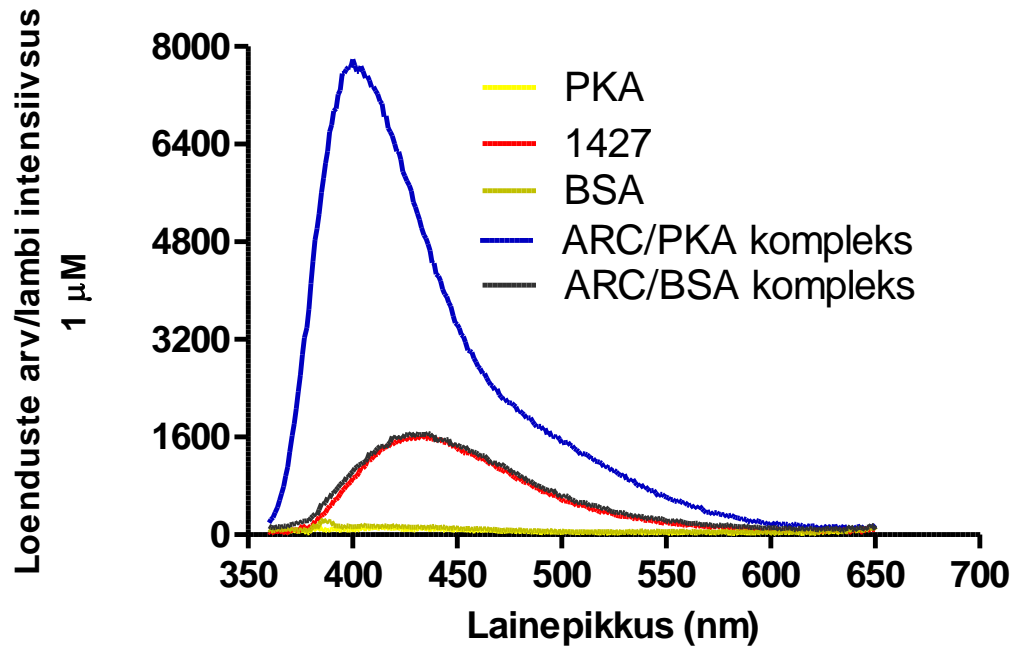
**Lisa 1.** ARC-1427 madalaima energiaga konformeer. Konformeer arvutati programmiga MarvinSketch (version 6.1)



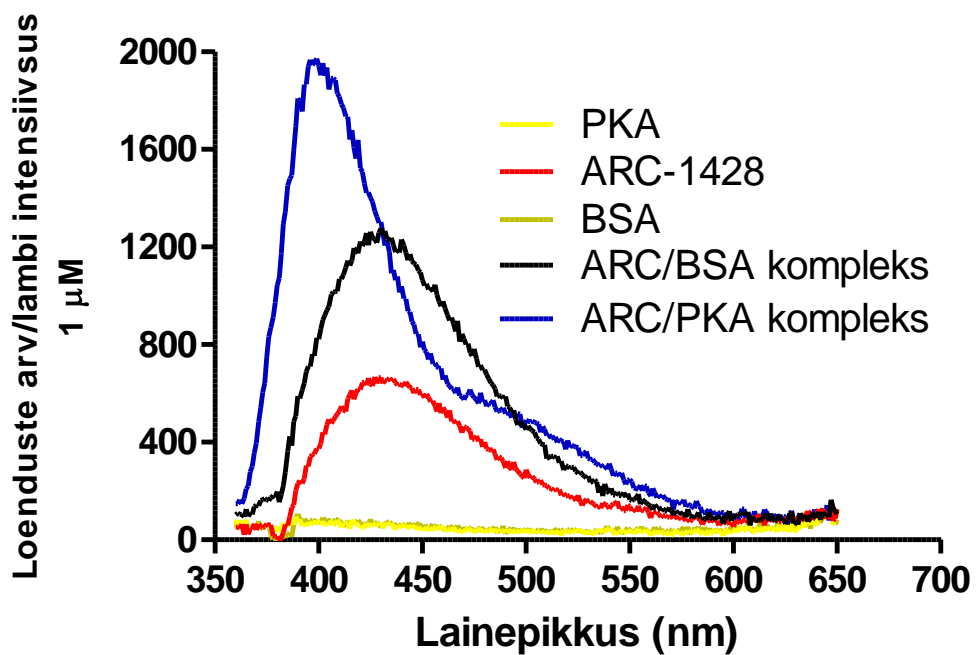
**Lisa 2.** ARC-Lum(-) sondi ARC-668, PKAc, BSA ja nende segude fluorestsentsi emissioonispektrid. Ergastav lainepikkus oli 340 nm.



**Lisa 3.** ARC-Lum(-) sondi ARC-1427, PKAc, BSA ja nende segude fluorestsentsi emissioonispektrid. Ergastav lainepikkus oli 340 nm.



**Lisa 4.** ARC-Lum(-) sondi ARC-1428, PKAc, BSA ja nende segude fluorestsentsi emissioonispektrid. Ergastav lainepikkus oli 340 nm.



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Maikel Pulk  
(sünnikuupäev: 11.05.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teosele  
Trüptofaani ja ARC-Lum(-) sondi vahelise energiaülekande uurimine

mille juhendaja on Kadri Ligi,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2014